

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

КОНУП ЛЮДМИЛА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 632.35:632.4:633.36/.37:579.88

**БАКТЕРІАЛЬНИЙ РАК ВИНОГРАДУ
І ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАХОДІВ ЩОДО ОБМЕЖЕННЯ ЙОГО РОЗВИТКУ
В ПІВДЕННОМУ РЕГІОНІ УКРАЇНИ**

06.01.11 «Фітопатологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора сільськогосподарських наук

Київ – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Роботу виконано в Національному науковому центрі «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» Національної академії аграрних наук України

Науковий консультант доктор біологічних наук,
професор, академік НААН,
заслужений діяч науки і техніки України
Кирик Микола Миколайович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Бабаянц Ольга Вадимівна,
Одеська державна сільськогосподарська
дослідна станція НААН,
в. о. директора

доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Мельничук Федір Степанович,
Державне підприємство «Центральна
лабораторія якості води та ґрунтів
Інституту водних проблем і меліорації НААН,
директор

доктор сільськогосподарських наук, професор
Туренко Володимир Петрович,
Державний біотехнологічний університет,
професор кафедри фітопатології та ентомології

Захист відбудеться «29» грудня 2021 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.02 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «26» листопада 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. О. Сикало

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Бактеріальний рак – хвороба, яка дуже поширена на виноградниках всього світу і завдає великих збитків (Чичинадзе та ін., 1995; Malenin, 1970; Lehoczky, 1968; Bauer et al., 1994; Szegedi, 1996; Jager, 1990; Burr, Otten, 1999; Kawaguchi et al., 2005). Континентальний клімат України, періодичні морозні та механічні пошкодження багаторічної деревини призводять до високих рівнів прояву бактеріального раку (до 50 %) (Мілкус та ін., 2005). Хвороба не внесена в європейську систему сертифікації і це пов'язано з тим, що в таких великих виноградарських країнах, як Італія, Франція, Німеччина, Австрія, які експортують значну кількість саджанців в Україну, часто мають латентну форму, що приводить до її поширення (Мілкус та ін., 2012).

Збудником бактеріального раку є бактерія *Agrobacterium tumefaciens* Smith and Townsend 1907, згідно нової систематики – *Rhizobium vitis* Young 2001, Willems 2006. Симптоми ураження визначаються пухлинними наростами рослинної тканини. Хвороба є системною (Lehoczky, 1971). Вегетативне розмноження уражених кущів призводить до виробництва інфікованого садивного матеріалу, що сприяє її поширенню.

До цього часу ефективні заходи захисту винограду від бактеріального раку були відсутні. Вони склалися, в основному, з удосконалення методів діагностики і виробництва садивного матеріалу, вільного від патогену. Саме тому необхідно провести детальний аналіз причин поширення бактеріального раку в останні роки в Україні у зв'язку зі змінами клімату, а також застосування ефективного комплексу захисних методів направлених на обмеження поширення хвороби.

Якщо контроль карантинних захворювань пов'язаний з вибірковою діагностикою садивного матеріалу, що ввозиться в країну, то обмеження розповсюдження бактеріального раку є складною науковою і практичною проблемою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано на базі лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН, акредитованої відповідно до міжнародного стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2005 в межах науково-дослідних робіт Національної академії аграрних наук України «Розробити та застосувати комплекс молекулярно-біологічних методів діагностики вірусних і бактеріальних хвороб винограду з метою отримання здорового садивного матеріалу цінних сортів і клонів винограду» (номер державної реєстрації 0198U002660); «Комплексна оцінка впливу вірусних хвороб винограду на якість продукції виноградарства» (номер державної реєстрації 0111U003754); «Моніторинг вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб винограду в Україні з метою визначення шляхів підвищення якості продукції виноградарства і виноробства до рівня вимог ЄС на 2016–2020 рр.» (номер державної реєстрації 0116U001166).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було вивчити поширення бактеріального раку на виноградниках півдня України і розробити хімічні, біологічні та профілактичні захисні заходи.

Для досягнення мети було поставлено такі завдання:

- провести моніторинг ураженості виноградних насаджень півдня України бактеріальним раком винограду;
- ідентифікувати збудника хвороби серологічним і молекулярно-біологічним методами діагностики;
- виділити ізоляти агробактерій і дослідити їх антагоністичні властивості проти збудника бактеріального раку;
- дослідити стійкість різних сортів винограду проти хвороби;
- вивчити вплив термотерапії на збудника бактеріального раку винограду.
- провести систематичне вивчення антимікробної активності для широкого ряду аліфатичних, циклоаліфатичних, ароматичних краун-ефірів з метою визначення активного хімічного препарату для захисту виноградних рослин від бактеріального раку;
- порівняти різні гомологічні ряди краун-ефірів за їх антимікробними властивостями.
- дослідити механізм антимікробної дії краун-ефірів.

Об'єкт дослідження – збудник бактеріального раку винограду, його розповсюдження, патогенез спричиненої хвороби.

Предмет дослідження – удосконалення молекулярно-біологічних методів діагностики бактеріального раку винограду; біологічні, хімічні та інші заходи захисту виноградних рослин від хвороби.

Методи дослідження: фітопатологічні, мікробіологічні, серологічні, молекулярно-біологічні, біохімічні дослідження, математично-статистичні методи оцінки достовірності отриманих експериментальних результатів.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в узагальненні сучасних відомостей щодо контролю бактеріального раку винограду, удосконаленні методів діагностики і практичного обґрунтування захисних заходів.

Вперше:

- проведено моніторинг ураженості бактеріальним раком виноградних насаджень в південному регіоні України і досліджено їх стан у зв'язку зі змінами клімату;
- вивчено стійкість проти хвороби сортів винограду, що вирощуються в районах проведення досліджень;
- розроблено експрес-метод ідентифікації пухлин, які були викликані бактеріальною інфекцією;
- вивчено антимікробну і протипухлинну активність нового класу органічних сполук – краун-ефірів (циклополіефіри) і можливість використання їх в якості високоефективних антимікробних і протипухлинних засобів захисту. Проведено скринінг антимікробної активності понад 200 краун-ефірів різних функціональних груп цього класу, досліджено механізм антимікробної дії найбільш активних представників;

– розроблено та впроваджено мультиплексний метод ПЛР-ідентифікації патогенів різних типів Ті-плазмід;

– досліджено вплив водної температурної обробки різних режимів на збудника бактеріального раку винограду;

удосконалено метод ПЛР-діагностики у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією для ідентифікації патогену;

дослідження набули подальшого розвитку, а саме виявлено ізоляти непатогенних агробактерій, що мають антагоністичні властивості щодо патогену.

Практичне значення одержаних результатів. У результаті проведених досліджень розроблено систему захисту виноградних рослин від бактеріального раку винограду, яка була запроваджена для виробництва сертифікованих саджанців винограду у виноградному розсаднику Херсонської області.

Досліджено сорти винограду різні за стійкістю проти бактеріального раку, що дає можливість створення виноградників з таких сортів.

Досліджено ізоляти агробактерій з притаманними антагоністичними властивостями щодо збудника бактеріального раку. Вони були рекомендовані для використання у виноградарських господарствах Одеської, Миколаївської і Херсонської областей з метою запобігання вторинного ураження саджанців ґрунтовою інфекцією.

Підібрано оптимальні режими водної температурної обробки виноградного матеріалу для оздоровлення його від бактеріального раку, що було впроваджено в виноградному розсаднику Херсонської області. Використання термообробки виноградної лози значно скоротило кількість патогенних агробактерій (збудника бактеріального раку).

Лабораторіям фітосанітарних і карантинних служб України було рекомендовано модифікований молекулярно-біологічний метод ідентифікації збудника бактеріального раку винограду з використанням полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (РЧ-ПЛР) для діагностики латентної форми бактеріального раку у імпортованих саджанцях.

Виявлено високу антимікробну активність у нового класу сполук – краун-ефірів. Виявлено представників цієї групи, що мають антимікробну дію до збудника бактеріального раку винограду та проявляють протипухлинну активність. Вивчений взаємозв'язок структура – активність в рядах краун-ефірів може бути використаний для цілеспрямованого синтезу нових активних сполук.

Особистий внесок здобувача. Дисертацію виконано автором особисто в лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН. Здобувачем проаналізовано вітчизняну та іноземну наукову літературу за темою дисертації; проведено ідентифікацію вилученого збудника бактеріального раку винограду, визначено антимікробну дію органічних сполук; проведено аналіз експериментальних даних у порівнянні з відомими антимікробними сполуками, зроблено емпіричний аналіз активності досліджуваних речовин, механізм їх протимікробної дії; обґрунтовано

застосування відповідних методик, виконано планування та проведення дослідів щодо вивчення бактеріального раку у зв'язку зі змінами клімату; проведено тестування зразків рослинного матеріалу серологічними, молекулярно-біологічними методами на приховане ураження патогеном; проведено аналіз і узагальнення результатів експериментів; сформульовано висновки і науково обґрунтовано пропозиції виробництву, одержано наукові результати, які оброблено статистично, підготовлено матеріали до друку. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації було представлено для обговорення на звітних сесіях Вченої ради Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН (м. Одеса, 1995–2020 рр.); Всесоюзній міжуніверситетській конференції «Биологии клетки» (м. Тбілісі, Грузія, 1985 р.); 15th International Symposium on Macrocyclic Chemistry (м. Одеса, 1990 р.); 5th International Seminar of Inclusion Compound (м. Гданськ, Польща, 1994 р.); XIX Українській конференції з органічної хімії (м. Львів, 2001 р.); науковому семінарі «Связь структура-активность биологически активных соединений» (м. Гурзуф, 2002 р.); XXVII International Symposium on Macrocyclic Chemistry (США, 2002 р.); Міжнародному симпозиумі із супрамолекулярній хімії (м. Київ, 2003 р.), Міжнародній науковій конференції «Мікробні біотехнології» (м. Одеса, 2006 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 180-річчю Національного Інституту виноградарства і виноробства «Магарач» (м. Ялта, 2008 р.); XII з'їзді товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Ужгород, 2009 р.); Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми прикладної генетики, селекції та біотехнології рослин» (м. Ялта, 2009 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Состояние и перспективы развития отечественной научной школы виноградарства и виноделия в XXI веке» (м. Одеса, 2009 р.); III Ukrainian-Polish wail Conference «Microbiology on Service for Human» (м. Одеса, 2009 р.); 16th ICVG Meeting (м. Париж, Франція, 2009 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Состояние и перспективы развития отечественной научной школы виноградарства и виноделия в XXI веке» (м. Одеса, 2009 р.); VI Міжнародній науково-практичній конференції «Геном рослин VI» (м. Одеса, 2010 р.); конференції «Интегрированная защита растений: стратегия и тактика» (м. Прилуки, 2011 р.); 17th ICVG Meeting (м. Девіс, Каліфорнія, США, 2012 р.); 18th ICVG Meeting (м. Анкара, Туреччина, 2015 р.).

Публікації. Основні результати досліджень за темою дисертації опубліковано в 67 наукових працях, з яких 3 монографії, 2 розділи в колективних монографіях, 20 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, 6 статей у наукових виданнях інших держав, 7 статей в інших наукових виданнях, науково-практичні рекомендації, патент України на корисну модель, 2 авторських свідоцтва, 25 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 324 сторінках. Робота складається з анотацій, вступу, огляду літератури, описання матеріалів і методів дослідження, експериментальної частини, висновків і пропозицій виробництву, додатків. Дисертація містить 42 таблиці, 45 рисунків. Список проаналізованих джерел літератури включає 422 позиції.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури наведено характеристику збудника бактеріального раку винограду, симптоми хвороби, шкідливість, поширення у світі та збитки, які вона завдає виноградарству; охарактеризовано методи діагностики хвороби, а також заходи захисту винограду від бактеріального раку, наведено технологію виробництва сертифікованого садивного матеріалу винограду вільного від патогену.

МІСЦЕ, УМОВИ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ПРОВЕДЕННИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Полеві дослідження і фітосанітарне обстеження проводили на території Одеської, Миколаївської і Херсонської областей південного регіону, що відноситься до південного степового агрокліматичного району, впродовж 2012–2020 рр. Лабораторні дослідження проведено у лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН. Вплив термообробки на збудника бактеріального раку в уражених виноградних рослинах досліджували у лабораторних умовах та на промисловому обладнанні в прищеплювальному комплексі ЗАО «Одеський коньячний завод». Вивчали 69 клонів прищепних і підщепних сортів і 54 сортів рядового матеріалу як вітчизняного, так і імпортного виробництва.

Для проведення мікробіологічних і молекулярно-біологічних досліджень використовували колекційні штами патогенних агробактерій: *IDI*, *B6*, *121-B*, *C-58*, *8628*, *FACH*, *Fa-2*, *Ag20*, *Ag63*, *Ag158*, *Rhizobium radiobacter* ATCC 23308, *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Townsend 1907) Conn 1942; *Rhizobium radiobacter* B-10231, *Agrobacterium radiobacter*55; умовно патогенні штами: *Pseudomonas aureofaciens*, *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10702; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (FDA 209P); ізоляти агробактерій, виділених з рослинного матеріалу винограду і ґрунту ризосфери виноградників.

Органічні хімічні сполуки, що використовувалися для дослідження антимікробної і протипухлинної дії на збудника бактеріального раку: краун-ефіри різних гомологічних рядів, купролон і юглон. Синтез досліджених речовин було здійснено в Фізико-хімічному інституті імені О. В. Богатського НАН України (м. Одеса).

У роботі застосовували лабораторне обладнання ПЛР-лабораторії, яке пройшло калібрування в Національному науковому центрі «Інститут метрології» (м. Харків) та ТОВ «ЛАБ-ТЕСТ» (м. Одеса).

Для виявлення бактеріального раку винограду проводили візуальний огляд за симптомами ураження виноградних насаджень в Одеській, Миколаївській і Херсонській областях. В Одеській області були обстежені виноградники: дослідних господарств Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН ДГ «Таїровське» і ДП ДГ «імені О. В. Суворова», клоно-дослідної і селекційної ділянки та базові маточники Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН загальною площею 400 га і більше ніж 2000 га виноградних насаджень промислових виноградників АСТ «Украгро», ТОВ «Технолог», ТОВ «Шустов Агро», ПрАТ «Придунайський», ТОВ «Вітіс Агро». У Миколаївській області обстежували виноградники ДП «Коблево», площею 921 га, а також виноградники ДП «Володимирське», площею 540 га. У Херсонській області дослідження проводили в КП Агрофірма, радгосп «Білозерський» на виноградниках, площею 820 га та виноградній шкілці площею 10 га.

Виноградники були закладені як клоновим, так і рядовим садивним матеріалом вітчизняного та імпортного виробництва, інтродукованого з Франції, Італії, Німеччини, Сербії.

Ізоляти виділяли мікробіологічним методом шляхом висіву на напів-селективне поживне середовище Рой і Сассера (Roy & Sasser, 1983). Ідентифікацію бактерій проводили морфологічними, серологічними і молекулярно-біологічними методами. ДНК виділяли із добових агробактерій, що культивували на картопляному агарі (Haas et al., 1995). ПЛР проводили відповідно до атестованої методики МВВ 002-85/3-2006. «Виявлення збудника бактеріального раку (*Agrobacterium tumefaciens (vitis)*) винограду методом полімеразної ланцюгової реакції», а також ДСТУ 3355-06 «Продукція сільсько-господарська рослинна. Методи відбору проб при карантинному огляді та експертизи», ДСТУ 4390:2005 «Технічні умови. Саджанці винограду та чубуки виноградної лози», ДСТУ 8562:2015 «Маточники та садивний матеріал. Методи виявлення збудників вірусних хвороб та бактеріального раку». Для виявлення збудника бактеріального раку використовували метод імуноферментного аналізу (ІФА). Результати ІФА фіксували за допомогою імуноферментного аналізатора Dynatec MR-600 (США) при оптичній щільності 406 нм. Для постановки ПЛР у режимі реального часу, пробопідготовку та виділення ДНК проводили як і для класичної ПЛР з гель-електрофоретичною детекцією. ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією проводили з використанням прямого і зворотного праймерів, флуоресцентно мічених ДНК-зондів. Відбір, зберігання і підготовку зразків рослин винограду проводили згідно з стандартом ISO 16578:2013. Для проведення класичної ПЛР використовували наступні пари праймерів: virD2A/virD2CATGCCCGATCGAGCTCAAGT/TCGTCTGGCTGACTTTGTCAT AA-224bp (Haas et al, 1995); ipt 1/iptGATCG(G/C)GTCCAATG(CT)TGT/GATA TCCATCGATC(TC)CTT-427 bp (Haas et al., 1995); PGF/PGRGGGGCAGGATGC GTTTTTGAG/GACGGCACTGGGGCTAAGGAT-466 bp (Szegedi et al., 2002); VIRFF₁VIRFR₂F:TGAAGAGCGGTGTCGTGCTGR:AATCAGCGGCTTGCAGGT

СТ-382 bp (Bini et al., 2008), позитивними контролями були: один із патогенних штамів *R. tumefaciens* FA2, A348, C58 і A281, негативним контролем – деіонізована вода. Розмір продуктів ампліфікації визначали згідно маркера молекулярної маси ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoScientific) – плазмиди pUC19, розрізаної рестрикційною ендонуклеазою MspI (Fermentas) маркера, що містить фрагменти ДНК, близькі за розміром до необхідного у даному випробуванні. Експерименти проводили в трьох повторностях.

Для постановки ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією, пробопідготовку та виділення ДНК проводили як і для класичної ПЛР з гель-електрофоретичною детекцією. ПЛР у режимі реального часу проводили з використанням прямого і зворотного праймерів, флуоресцентно мічених ДНК-зондів, реакційної суміші, в кількості 20 мкл ($H_2O_{\text{деіон}}$ – 8,5 мкл; 10×ПЦР-буфер – 2,5 мкл; 4мМ dNTP – 2,5 мкл (1,76 мМ – 2,84 мкл); pr1 – 0,5 мкМ; pr2 – 0,5 мкМ; флуоресцентний зонд – 0,1 мкМ, Таq-полімераза (2,5 u/μl) (Pfu DNA, Fermentas, Литва) – 0,25 мкл; Mg^{2+} – 3,0 мМ і 5 мкл НКЗ, або ПКЗ, або внутрішній контроль, або досліджуваний зразок (на дно пробірки). Концентрації прямого, зворотного праймерів, флуоресцентних ДНК-зондів було підібрано емпірично. Для контролю проведення реакції використовували негативний контрольний зразок (НКЗ) – 1×ПЛР-буфер і позитивний контрольний зразок (ПКЗ) – референтний штам збудника бактеріального раку FA2. Ампліфікацію проводили в програмованому термоциклері Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралія). Облік результатів аналізу, розрахунок порогових циклів здійснювали за допомогою програмного забезпечення програми Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.

Аналіз винограду за агробіологічними показниками, а також кількість і якість врожаю винограду з дослідних кущів проводили за загальноприйнятими методиками (Починок, 1976; Мельник, Щигловская 1951).

Оздоровлення садивного матеріалу від збудника бактеріального раку відбувалося за допомогою використання методів культури апікальної меристеми і водної термотерапії. За допомогою антимікробного скринінгу краун-ефірів різних гомологічних рядів було виявлено активні представники, які мали і протипухлинні властивості.

Усі математичні розрахунки проводили із використанням спеціальних математичних програм (Statistica 6.0, Microsoft Excel 2010).

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Візуальне обстеження виноградників півдня України. Останнім часом відмічалися погіршення епідеміологічної обстановки на промислових виноградниках України, що частково пов'язано із закладанням молодих виноградників імпортованим садивним матеріалом, появою нових сприятливих до бактеріального раку сортів і клонів, кліматичними змінами у регіоні, які призвели до збільшення кількості виноградників, уражених збудником бактеріального раку. Складність контролю інфекції – це перша причина того, що бактеріальний рак винограду не входить до загальноприйнятої системи

сертифікації, яка діє в країнах Європейської Союзу. Другою причиною цього є низькі рівні прояву бактеріального раку в найбільших виноградарських країнах (Італія, Франція, Німеччина), отже, і відсутність у них великих збитків від цієї хвороби.

За даними Одеської обласної адміністрації на долю Одеської області припадає 60 % виноградних насаджень, 8 % – в Миколаївській області, 7 % – в Херсонській і решта в інших областях України (рис. 1).

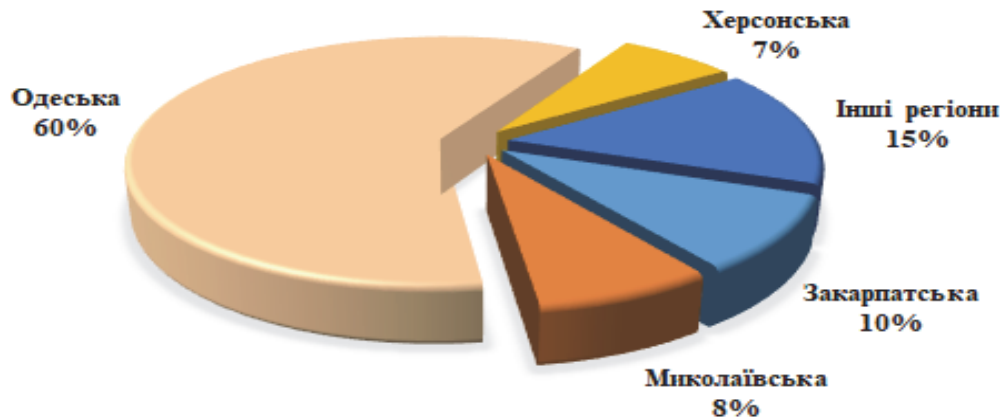


Рис. 1. Частка областей України у виробництві виноградної продукції (за даними Одеської обласної державної адміністрації України, середнє за 2019–2020 рр.)

Як видно із даних, наведених на рис. 1, найбільша частка виноградарської продукції і промислових насаджень винограду в південному регіоні України припадає на Одеську, менше – на Миколаївську і Херсонську області. Реєстр сортів виноградних рослин України з 2014 р. містить 110 найменувань, з яких тільки 38 % імпортовані, 62 % сортименту складають сорти української селекції (рис. 2).

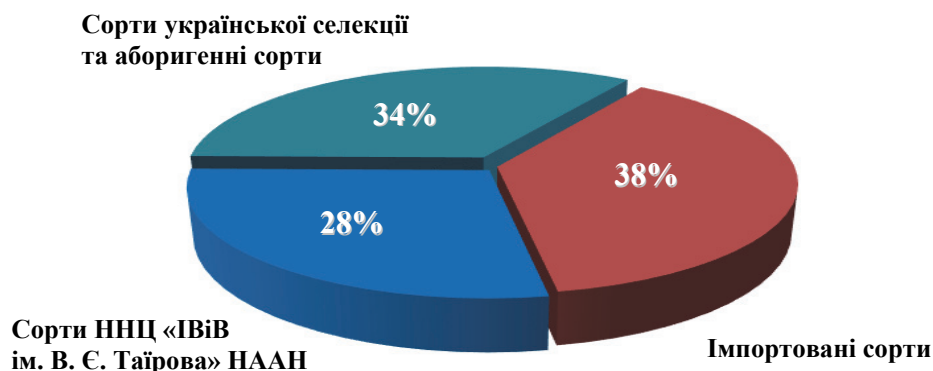


Рис. 2. Співвідношення сортів винограду української селекції, аборигенних до імпортованих сортів (за даними відділу селекції Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН)

За останній час, у зв'язку з нестачею сертифікованого садивного матеріалу в Україні, було імпортовано в ці області велику кількість садивного

матеріалу із Франції, Німеччини, Сербії, Італії, який був латентно уражений збудником бактеріального раку. Закладка виноградників зараженими саджанцями призвела до погіршення якості, зменшення продуктивності промислових насаджень. Уражені кущі відставали у рості і розвитку, що позначилося на якості врожаю. На жаль, ввезений садивний матеріал не був перевірений на наявність латентної інфекції, що стало причиною збитків у виноградарських господарствах. Викликає занепокоєння і те, що останнім часом спостерігається тенденція значного зменшення площ під виноградниками (майже в 10 разів з 802,9 га у 2010 р. до 73,0 га у 2020 р.), так і площ під виноградниками (рис. 3).

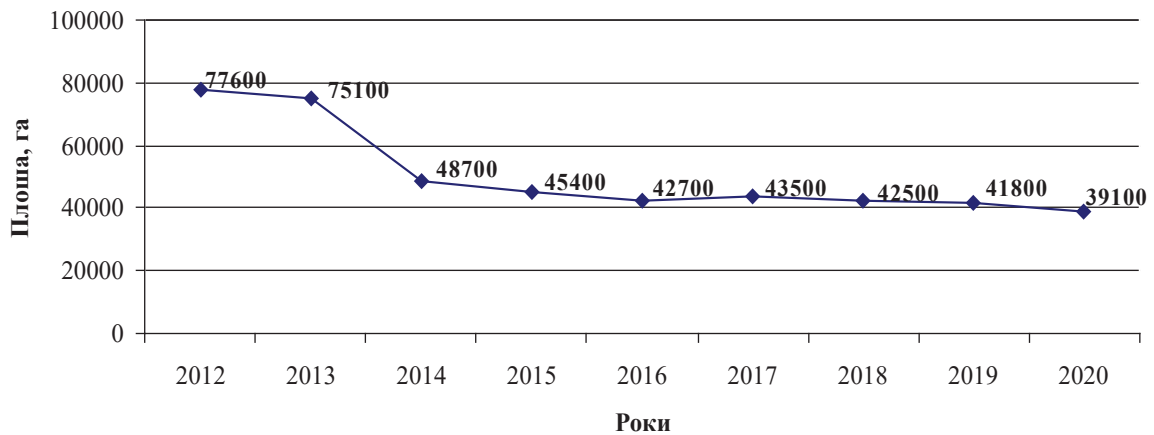


Рис. 3. Динаміка зменшення загальної площі під виноградниками України протягом 2012–2020 рр. (за даними Державної служби статистики України)

Зменшення площ під виноградниками майже в два рази (з 2012 до 2020 р.), на нашу думку, відбулося за багатьох причин, в тому числі й за рахунок високого відсотка ураження виноградних насаджень вірусними, фітоплазмовими хворобами і бактеріальними раком.

Бактеріальний рак винограду – небезпечна хвороба, яка завдає значної економічної шкоди: хворі рослини або гинуть, або стають чутливими до стресових умов. Візуально симптоми хвороби проявляються на виноградних кущах у вигляді утворення пухлин в місцях поранення (місце щеплення, штампб (рис. 4, А, Б) і на коренях). Пухлини іноді досягають величезних розмірів: до 10 см в діаметрі.

Хвороба значно знижує вихід саджанців у розсаднику, але, зазвичай, не викликає серйозних пошкоджень на старих рослинах. На пагонах винограду в червні – серпні виникають дрібні пухлини, які спочатку мають зелений або рожевий колір, потім поступово збільшуються в розмірі, стають горбистими, твердими і темніють (рис. 5).

Пухлини створюють дефіцит елементів живлення для органів рослини, перешкоджають сокоруху, що може привести до загибелі виноградного куща.

Результати фітосанітарного обстеження виноградників у Одеській, Миколаївській і Херсонській областях, ступінь ураженості різних сортів і клонів наведено в табл. 1.



А

Б

Рис. 4. Симптоми бактеріального раку винограду: А – пухлина на місці щеплення у прищепної рослини сорту Мерло; Б – пухлина на штамі винограду сорту Каберне Совіньон (Одеська область, 2020 р.)



Рис. 5. Пухлина на місці щеплення прищепи і підщепи, сорт Шардоне (Миколаївська область, 2017 р.)

**Дані фітосанітарного обстеження виноградних насаджень
в різних господарствах Одеської, Миколаївської і Херсонської областей,
середнє за 2012–2020 рр.**

Господарство	Область	Загальна площа, га	Кількість досліджуваних сортів і клонів, шт.
Базовий маточник ННЦ «ІВіВ імені В. Є. Таїрова»	Одеська	0,6	10
Селекційна ділянка ННЦ «ІВіВ імені В. Є. Таїрова»	#	20	56
Клоно-дослідна ділянка ННЦ «ІВіВ імені В. Є. Таїрова»	#	10	15
ДП ДГ «Таїровське»	#	320	6
ДП ДГ «імені О. В. Суворова»	#	560	15
АСТ «Украгро»	#	980	4
ТОВ «Технолог»	#	120	2
ТОВ «Шустов-Агро»	#	90	2
ДП Агро-фірма «Шабо»	#	1100	8
ТОВ «Вітіс-Агро»	#	25	2
ПрАТ «Придунайський»	#	150	10
ДП «Коблево»	Миколаївська	921	18
ДП «Володимирське»	#	540	6
КП «Агрофірма- радгосп Білозерській»	Херсонська	830	12

Сортимент винограду України базується як на імпортованих сортах, так і на сортах селекції науково-дослідних установ країни. Його формування відбувалося під впливом потреб виноробної промисловості, консервативність якої призвела до того, що переважну частку сортименту складають класичні сорти *Vitis vinifera* L.: Каберне Совіньйон, Мерло, група сортів Піно, Шардоне, Аліготе, Совіньйон та деякі інші, які є чутливими до збудника бактеріального раку (табл. 2).

Як видно з табл. 2 сортовий склад виноградних насаджень півдня України, який представлено сортами іноземної селекції визначається високою та середньою чутливістю до бактеріального раку винограду, на відміну від сортів української селекції.

**Ступінь ураженості сортів винограду збудником бактеріального раку
(візуальні спостереження), середнє за 2014–2020 рр.**

Назва сорту	Ступінь ураження бактеріальним раком	Походження садивного матеріалу
Каберне Совіньйон клон 15	Високий	Франція
Каберне Совіньйон, клон 441	Високий	#
Каберне Совіньйон, клон 1473	Високий	#
Каберне Фран, клон ISV101	Високий	#
Совіньйон зелений, клон 4442	Середній	#
Совіньйон білий, клон 242	Середній	#
Шардоне, клон 96	Середній	#
Шардоне, клон 130	Середній	#
Піно нуар, клон 667	Низький	#
Піно білий, клон VCR5	Низький	#
Піно Грі, клон FR49-207	Низький	#
Аліготе, клон 263	Низький	#
Мерло, клон VCR1	Середній	#
Рислінг рейнський, клон 13101	Низький	Німеччина
Трамінер рожевий, клон VCR6	Низький	Франція
Сухолиманський білий, клон 244	Низький	Україна
Одеський чорний, клон 11	Високий	#
Іршаї Олівер, клон 3524	Низький	Франція
Мускат одеський, клон 3432	Середній	Україна
Мускат Оттонель, клон 12122	Середній	Італія
Тельті курук, клон 7131	Середній	Україна
Голубок, клон 4656	Низький	#
Сурученський білий, клон 36333	Низький	#
Мускат янтарний, клон 574	Низький	#
Мечта, клон 244	Низький	#
Мечта, клон 323	Низький	#
Восторг, клон 60162	Низький	#
Восторг, клон 7383	Низький	#
Ланка, клон 4062	Низький	#
Кобзар, клон 30115	Середній	#
Королева виноградників, клон 2695	Низький	#
Мускат гамбургський, клон 932	Середній	#
Одеський сувенір, клон 8022	Середній	#
Оригінал, клон 5834	Низький	#
Оригінал, клон 4024	Низький	#
Аркадія	Низький	Україна
Кеша	Середній	#
Молдова	Середній	Молдова
Берландієрі × Ріпарія СО4, клон 1791	Низький	Німеччина
Берландієрі × Ріпарія Кобера 5ББ, клон 211161	Високий	Франція
Ріпарія × Рупестріс 101-14, клон 1182	Низький	Франція

Найвищий рівень ураження (ступінь ураження площі поверхні штамбу та розмір пухлин) притаманний сорту Каберне Совіньйон – до 35 %. Пухлини великі до 10–15 см у діаметрі, на зрізі часто із антоціановим забарвленням, розташовані уздовж всього штамбу (див. рис. 4, Б).

Середній рівень ураження характерний для технічних сортів із темним забарвленням ягід – Мерло. Пухлини на штабмі мають середній розмір – до 10 см у діаметрі, по штамбу і рукавах поширюються в значно меншому ступені, ніж у сорту Каберне Совіньйон (див. рис. 4, А).

Середніми та переважно низьким рівнем ураження патогеном характеризуються сорти винограду із світлим забарвленням ягід: Шардоне, Аліготе та Совіньйон зелений. Симптоми відрізняються чіткою локалізацією окремих пухлин, переважно без поширення по штамбу (див. рис. 5).

Технічні сорти української селекції часто є похідними від європейських класичних сортів (сорт Одеський чорний – Каберне Совіньйон × Алікант Буше, Сухолиманський білий – Шардоне × Плавай) також мають схильність до ураженості бактеріальним раком. Так, рівень ураження сорту Одеський чорний коливається між високим та середнім, хоча в цілому розмір пухлин є меншим від тих, що утворюються на сорті Каберне Совіньйон, на цьому сорті також значно рідше утворюються пухлини уздовж штамбу.

У результаті візуального обстеження виноградників району проведення досліджень було виявлено наявність різного ступеня ураження кущів бактеріальним раком як на молодих, так і на плодоносних насадженнях. Так, ураженість технічних сортів становила: Каберне Совіньйон – до 35 %, Мерло – 25 %, Шардоне – 15 %. Невелика ураженість рослин збудником бактеріального раку (від 0,3 до 10 %) була виявлена на сортах: Піно нуар, Рислінг рейнський, клон 13101, Голубок, клон 4656, Мускат Магарача, Трамінер, Рислінг рейнський. Серед підщепних зразків ознаки цієї хвороби виявили на рослинах сорту Берландієрі × Ріпарія Кобера 5 ББ, клон 211161. При обстеженні молодих виноградних насаджень за період з 2012 до 2020 рр. спостерігали збільшення кількості рослин з симптомами хвороби у сортів Каберне Совіньйон, Мерло і Шардоне. Це свідчить про наявність латентної стадії хвороби, яка проявлялася симптомами протягом вирощування за сприятливих умов для розвитку збудника.

Фітосанітарне обстеження не завжди дозволяє візуально ідентифікувати бактеріальний рак і не може бути основним методом діагностики. Пухлини можна сплутати з калюсоутворенням на місті поранення у рослини. Тому слід проводити лабораторну діагностику і ідентифікацію збудника хвороби, який знаходиться в рослинах у латентній формі.

Вплив бактеріального раку на урожай і фізіологічні показники винограду. Шкідлива дія бактеріального раку відбивається на перебігу фізіологічних процесів винограду і, як наслідок, на врожаї. Проведені дослідження щодо вивчення впливу ураження рослин збудником бактеріального раку на врожай і агробіологічні показники різних сортів винограду дозволили встановити, що в середньому урожай знижувався

на 28,7 % сорту Каберне Совіньйон клон 15 і на 16,2 % сорту Шардоне клон 96, порівняно з контролем (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив бактеріального раку на агробіологічні показники і продуктивність винограду сорту Каберне Совіньйон клон 15 і Шардоне клон 96, середнє за 2014 - 2016 рр.

Сорт/ ураження	Кількість грон на кущі, шт.	Маса грона, г	Урожай з куща, кг	Урожайність,		Масова концентрація у соці ягід, г/дм ³	
				т/га	%	цукрів	титрованих кислот, у перерахунку на винну кислоту
Каберне Совіньйон клон 15							
кущі не уражені	31,6	79,5	2,75	6,49	100	202	7,7
кущі уражені	29,2	63,3	1,90	4,76	73,3	169	10,6
Шардоне клон 96							
кущі не уражені	18,4	142,5	2,62	6,56	100	190	9,0
кущі уражені	16,9	120,8	2,05	5,11	77,9	170	11,8
Р-значення							
Сорт (С)	<0,01	<0,01	<0,01	0,13		<0,01	<0,01
Ураження (У)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01		<0,01	<0,01
Взаємодія С × У	0,38	0,06	0,18	0,31		<0,01	0,94

Встановлено, що зниження врожаю на сортах хворих рослин відбувається за рахунок зменшення середньої кількості грон на кущі, маси одного грону, а також зменшення концентрація цукру в ягодах.

Крім того, ураження збудником негативно впливає на загальний річний приріст і визрівання лози. Таким чином погіршується не тільки якість сировини, що негативно впливає на отримання кінцевого якісного продукту у виноробстві, але й погіршується потенціал продуктивності у наступному вегетаційному році, що продемонстровано на сортах Каберне Совіньйон клон 15 і Шардоне клон 96 (табл. 4).

Діагностика бактеріального раку винограду. Дослідження цієї частини роботи було спрямовано на ідентифікацію виділених ізолятів бактерій із виноградних рослин.

Методом ІФА підтверджено, патогенність виділених ізолятів із різних частин виноградних рослин (табл. 5).

Як видно із даних, наведених у табл. 6, найвища концентрація збудника бактеріального раку (*Rhizobium vitis*) виявилася у пухлинах і у здерев'янілих чубуках виноградної лози.

**Вплив бактеріального раку на однорічні біометричні показники
винограду, середнє за 2012–2020 рр.**

Сорт/ ураження	Кількість пагонів на кущ, шт.	Середня довжина пагонів, см	Середній діаметр пагонів, мм	Об'єм однорічного приросту з куща, см ³	Середня довжина визрілої частини, см	Визрівання пагонів, %
Каберне Совіньйон 15						
кущі не уражені	40,0	125,1	6,4	1569	109,5	88,6
кущі уражені	36,3	112,2	5,8	1483	98,3	87,3
Шардоне клон 96						
кущі не уражені	17,9	148,7	9,4	1680	142,1	89,7
кущі уражені	16,5	109,6	8,7	1628	134,4	87,4
Р-значення						
Сорт (С)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,10
Ураження (У)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Взаємодія С × У	<0,01	<0,01	0,91	0,04	0,01	0,17

Таблиця 5

**Наявність збудника бактеріального винограду в різних ділянках рослин
методом ІФА за результатами детекції оптичної щільності**

Збудник	Концентрація збудника бактеріального раку винограду в різних частинах винограду (оптична щільність, OD 405), λ					
	листя	корені	молоді пагони	чубуки лози	пухлини	ягоди
<i>Rhizobium vitis</i>	0,300	0,560	0,430	0,945	0,980	не виявлено

Примітка. Дослідження проведено методом ІФА за результатами детекції оптичної щільності

Діагностику бактеріального раку та ідентифікацію його збудників як за симптомами, так і латентноуражених, проводили методом ПЛР з гелелектрофоретичною і гібридизаційно-флуоресцентною детекцією у форматі реального часу.

На першому етапі було перевірено всі ізоляти на відповідність виду ізолятів агробактерій. Для цього використовували пари праймерів PGF/PGR до цільового фрагменту гену *pehA* (466 bp) (Bini et al., 2008) для визначення виду бактерій (рис. 6).

Встановлено, що цільовий фрагмент (466 bp) до гену *pehA* було виявлено у всіх зразках пухлин, що свідчить про належність ізолятів до виду *R. vitis* і якого не мають штамів *R. tumefaciens* і *R. rhizogenes*

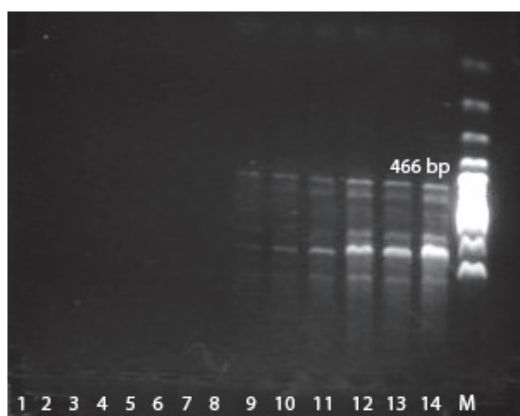


Рис. 6. Електрофореграма продуктів ампліфікації геномної ДНК *A. vitis* з системою праймерів PGF/PGR: 1 – негативний контроль (ПЛР – суміш без ДНК); 2–8 – негативні результати ампліфікації; 9–13 – виявлення патогенних ізолятів у зразках; 14 – позитивний контроль – штам *R. vitis* АВ3; М – маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п. н. (*Termo Scientific O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder*)

Для визначення вірулентності ізолятів, що містять Ті-плазмиду та ідентифікації їх по типу опінів використовували пари праймерів VIRD2A/VIRD2C до специфічних ділянок гену вірулентності (*virD2*) (вітопінового типу) і VIRFF1/VIRFR2 до цільового фрагменту гену *virF* (382 bp) *R. vitis* (октопінового чи нопалінового типу) (Bini et al., 2008) (рис. 7, А, Б).

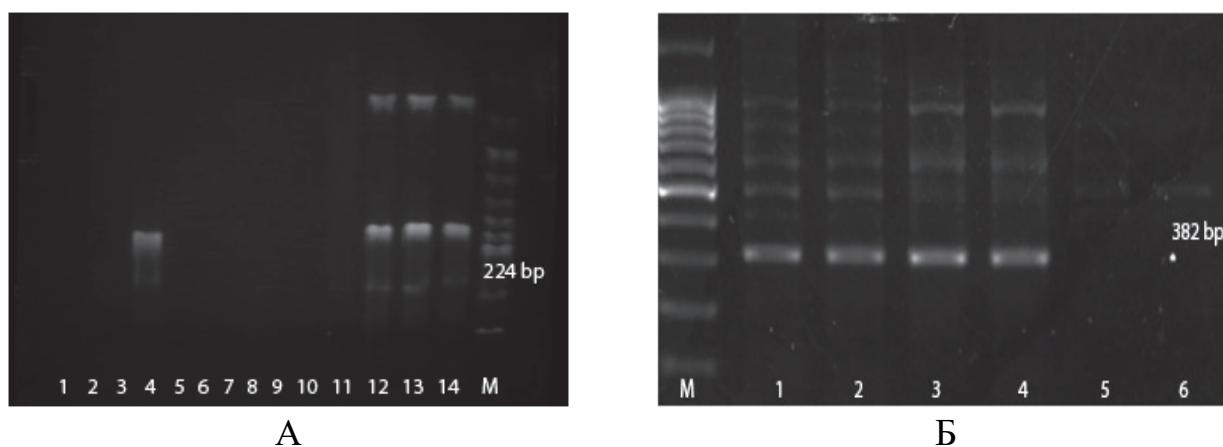


Рис. 7. А – електрофореграма продуктів ампліфікації геномної ДНК *R. vitis* з системою праймерів VIRD2A/VIRD2C: 1 – негативний контроль (ПЛР – суміш без ДНК); 2, 3 – негативні результати ампліфікації; 4 – позитивний контроль – штам *R. vitis* Fa-2; 5–11 – негативні результати ампліфікації; 12–14 – вірулентні ізоляти агробактерій; М – маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п. н. (*Termo Scientific O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder*)

Б – електрофореграма продуктів ампліфікації геномної ДНК *A. vitis* з системою праймерів VIRFF1/VIRFR2: 1–3 – виявлення патогенних ізолятів у зразках; 4 – позитивний контроль – штам *R. vitis* ATI; 5 – негативний результати ампліфікації; 6 – негативний контроль (ПЛР – суміш без ДНК); М – маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п. н. (*Termo Scientific O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder*)

Цільовий фрагмент до гену *virF* (382 bp) виявлено у 80 % досліджуваних зразків, що свідчить про наявність Ті-плазмід октопіного чи нопаліного типу, ген *virD2* – тільки в ізолятах, що містять Ті-плазмиду вітопіного типу (20 %).

Для зменшення витрат часу і вартості аналізу, а також підвищення продуктивності ПЛР-ідентифікації ізолятів було використано мультиплексну ПЛР (Johnson et al., 2013).

Відповідно до проведених досліджень в протокол мультиплексної ПЛР було включено праймери до вірулентного штаму *R. vitis* – PGF/PGR та по типах Ті-плазмід, що кодують фактори вірулентності VIRD2A/VIRD2C і VIRFF1/VIRFR2 (Bini et al. 2008) (рис. 8).

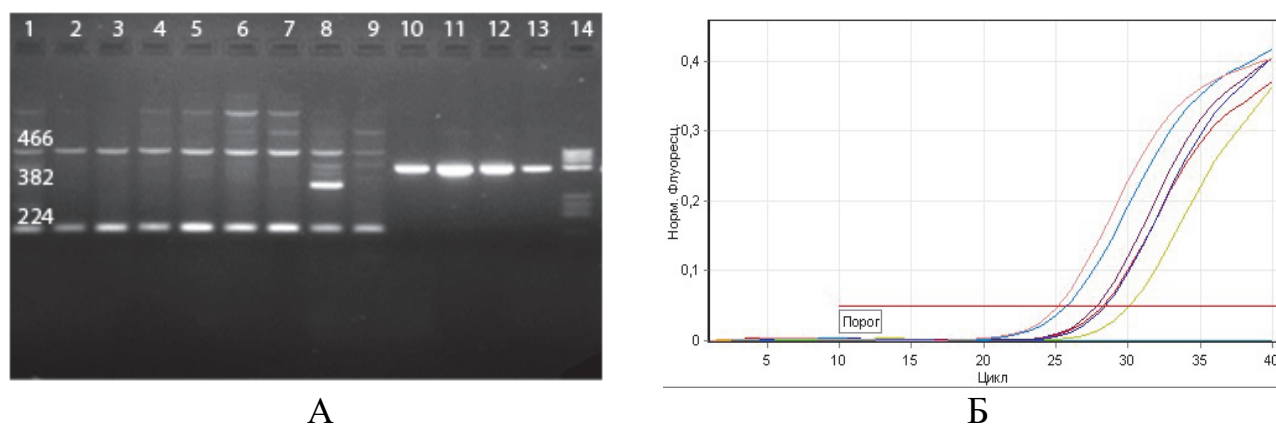


Рис. 8. А – результати мультиплексної ПЛР з трьома парами праймерів: PGF/PGR (466 bp), VIRFF1/VIRFR2 (382 bp) і VIRD2A/VIRD2C (224 bp): 1–12 досліджувані зразки; М – маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п. н. (*Thermo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder*) з електрофоретичною детекцією

Б – результати мультиплексної ПЛР з трьома парами праймерів: PGF/PGR (466 bp), VIRFF1/VIRFR2 (382 bp) і VIRD2A/VIRD2C (224 bp) з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією

За допомогою мультиплексної ПЛР було встановлено наявність збудника бактеріального раку *A. vitis* у всіх досліджених зразках, як з явними симптомами, так і в латентній стадії і мали різні типи плазмід: 80 % октопіново-нопалінового і 20 % – вітопінового.

У більшості зразків, відібраних в Одеській, Миколаївській і Херсонській областях було ідентифіковано наявність фрагментів *virD2* і *virF* генів одночасно, що свідчить про високу вірулентність агробактерій в цих зразках або про наявність змішаної інфекції (табл. 6).

На основі проведених досліджень встановлено, що всі зразки, які були відібрані на виноградниках і виділені з них агробактерії генетично відрізнялися між собою і в основному мали: октопінову Ті-плазмиду. У всіх досліджених ізолятів агробактерій було виявлено *rehA*, що доводить належність їх до *R. vitis*.

**Результати дослідження вірулентності у виявлених ізолятів
збудника бактеріального раку винограду, середнє за 2018–2020 рр.**

Сорт, клон	Виявлений ген патогенності		
	<i>rehA</i>	<i>virF</i> (октопін/ нопалін)	<i>virD2</i> (вітопін)
Каберне Совінйон, клон 169	+	+	+
Каберне Совінйон, клон R5	+	+	+
Каберне Совінйон, клон 1473	+	+	–
Каберне Совінйон, клон 15	+	+	+
Мерло, клон VCR1	+	+	–
Піно нуар, клон 667	+	–	–
Рислінг рейнський, клон 13101	+	–	–
Голубок, клон 4656	–	–	–
Шардоне, клон 96	+	+	–
Шардоне, клон 76	+	–	–
Одеський чорний, клон 11	+	+	–
Сухолиманський білий, клон 1632	–	–	–
Мускат Отгонель	+	+	–
Мечта, клон 244	–	–	–
Восторг, клон 60162	–	–	–
Кобзар, клон 30115	+	+	–
Мускат гамбургський, клон 932	+	+	–
Королева виноградників, клон 2695	–	–	–
Одеський сувенір, клон 8022	+	+	–
Кеша	+	–	–
Молдова	+	–	–
Берландієрі х Ріпарія СО4, клон 1791	–	–	–
Берландієрі × Ріпарія Кобера 5 ББ, клон 211161	+	+	–
Ріпарія × Рупестріс 101-14, клон 1182	–	–	–

Сортова сприйнятливість різних сортів винограду до ураження збудником бактеріального раку. Важливим моментом для отримання здорового сертифікованого садивного матеріалу є визначення сприйнятливості різних сортів і клонів винограду до збудника бактеріального раку. Для цього чубуки винограду (*V. vinifera* L.) різних районованих сортів і клонів штучно заражали референтними штамми патогенних агробактерій, а саме штамми *R. vitis* 271, Fa-2, IDI шляхом прокачування через судини чубуків суспензії агробактерій у кількості 10^9 КУО/мл. Через 14–20 діб інкубації при температурі 25–27 °С проводили облік наявності пухлин. Пухлини з'являлися на 14–21 день (табл. 7).

Як видно з табл. 7, всі досліджені сорти *V. vinifera* L. схильні до зараження патогенними штамми *R. vitis*. Тільки деякі сорти і клони сортів такі, як Піно нуар, клон 667, Голубок, клон 4656, Мечта, клон 244, з підщепних – Берландієрі × Ріпарія СО4, клон 1791 і Ріпарія × Рупестріс 101-14, клон 1182 у незначній мірі були стійкими до зараження окремими штамми *R. vitis*.

**Сортова сприйнятливість різних сортів винограду
до ураження збудником бактеріального раку, середнє за 2014–2016 рр.**

Сорт, клон винограду	Наявність пухлин після інокуляції референтними штамами <i>R. vitis</i>		
	271	Fa-2	IDI
Каберне Совіньйон, клон R5	+	+	+
Мерло, клон VCR1	+	+	+
Піно нуар, клон 667	–	–	+
Рислінг рейнський, клон 13101	+	+	+
Голубок, клон 4656	–	–	+
Каберне Совіньйон, клон 1473	+	+	+
Одеський чорний, клон 11	+	+	+
Сухолиманський білий, клон 1632	–	+	+
Мечта, клон 244	+	–	–
Восторг, клон 60162	+	+	+
Кобзар, клон 30115	+	+	+
Королева виноградників, клон 2695	–	+	–
Одеський сувенір, клон 8022	–	+	+
Кеша	+	+	+
Молдова	+	+	+
Берландієрі х Ріпарія СО4, клон 1791	+	+	–
Берландієрі × Ріпарія Кобера 5 ББ, клон 211161	+	+	+
Ріпарія × Рупестріс 101-14, клон 1182	–	–	+

Примітка. «–» – відсутність пухлин; «+» – наявність пухлин

Експрес-метод ідентифікації пухлин, які мали бактеріальне походження. При виробництві сертифікованих саджанців на місці щеплення розвивається калюсна тканина і її часто можна сплутати з пухлиною (рис. 9).



А



Б

Рис. 9. Калюсна тканина на апікальній (А) і базальній (Б) частинах чубуків винограду

Для того, щоб відрізнити пухлинну тканину від калюсної на виноградному чубуку, або прищепному саджанці використовували метод

виявлення опінів. Відомо, що патогенні *A. vitis* відрізняються між собою за типом Ті-плазмиди: октопін-, нопалін- і вітопінвмісні (Віні, 2008) і вже через кілька днів з моменту появи пухлини починається процес синтезу опінів. При обстеженні прищепних або кореневласних саджанців важливо використовувати швидкий метод для визначення пухлини, що виникають на місці поранення (прищепа, місце осліплення вічок). У результаті ідентифікації пухлин, які були виявлені на прищепних саджанцях, а також пухлин на виноградних кущах, встановлено, що досліджені галоподібні утворення були октопіновими і мали жовто-помаранчеву флуоресценцію при освітленні УФ-випромінювачем, водночас, калюсна тканина такого прояву не мала. Позитивним контролем був октопіновий штам *Rhizobium vitis* АВ3 (рис. 10).

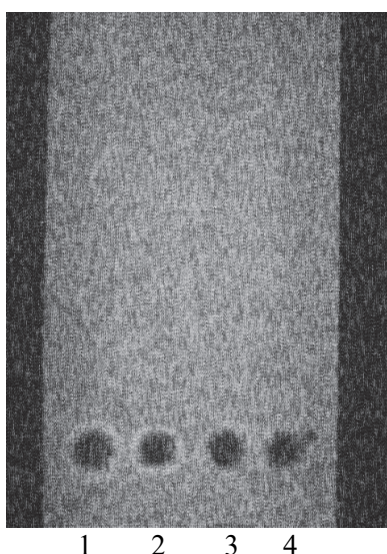


Рис. 10. Визначення пухлинної тканини за допомогою виявлення опінів: 1 – позитивний контроль *Rhizobium vitis* АВ3; 2 – пухлина на виноградному саджанці; 3 – негативний контроль *Escherichia coli* ATCC 25922; 4 – калюсна тканина

ЗАХОДИ ЩОДО ЗАХИСТУ ВИНОГРАДНИХ РОСЛИН ВІД ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ

Дослідження антагоністичних властивостей ізолятів агробактерій, виділених із ризосфери і міжряддя виноградників. Захист виноградних рослин від бактеріального раку раніше зводився до виконання профілактичних заходів, які дозволяли запобігти інокуляції рослин на ранній стадії розвитку і знищенню кущів винограду, які мали симптоми хвороби. Проте є цінні сорти, які не можна втрачати. Тому постає необхідність створення системи захисту виноградників від бактеріального раку і обмеження його розповсюдження.

Аналізуючи інформацію про наявність тих чи інших агробактерій, виділених з ґрунту різних областей південного регіону, можна підібрати певні штами-антагоністи, які б могли бути використані в якості потенційних біологічних препаратів для захисту винограду від цієї хвороби.

Нині вважається, що використання штамів-антагоністів є перспективним напрямком розроблення біологічних препаратів проти бактеріального раку.

Зараження виноградних рослин бактеріями *Rhizobium vitis* досить складний процес. На першому етапі завдяки хемотаксису агробактерії притягуються до пошкодженої ділянки рослини (коріння), у цей час *R. vitis* прикріплюється до пораненої частини і відбувається процес зараження збудником хвороби. Відомо, що гени патогенності штамів *Rhizobium* в основному розташовані на великих Ті-плазмідах (Suzaki, 2004). Наступним етапом відбувається перенесення частини цієї плазміди і вбудова її в ядерну ДНК рослини. Експресія генів ДНК призводить до синтезу ауксинів і цитокінінів клітинами рослин, що в кінцевому результаті призводить до аномального розростання тканин і утворення пухлин на рослині-хазяїні. Таким чином, рослини, які були оздоровлені різними методами при закладанні винограднику можуть бути заражені із ґрунту. Такі факти були відомі коли рослини отримані *in vitro* і вільні від бактеріального раку були повторно заражені ґрунтовою інфекцією. Бактерія спроможна виживати на інфікованих коріннях протягом багатьох років після викорчовування інфікованих виноградних рослин. Тому обробка кореневої системи саджанців штамми бактерій-антагоністів проти збудника бактеріального раку перед посадкою буде запобігати вторинному зараженню рослин ґрунтовим інокулюмом.

Для пошуку бактерій-антагоністів відбирали зразки ґрунту з ризосфери рослин і міжрядь виноградників Одеської, Миколаївської і Херсонської областей. Виділено по 50 ізолятів бактерій з ґрунту кожної області, які були проаналізовані за морфологічними, біохімічними показниками і визначена їх антагоністична активність.

Встановлено, що більшість виділених ізолятів, мали незначні антагоністичні властивості і пригнічували ріст збудника хвороби на 20–30 %, але декілька ізолятів агробактерій (ІЛВМ1, ІЛВМ2) значно інгібували ріст пухлин на стеблах тест-рослин томатів (*Solanum lycopersicum*) і соняшника (*Helianthus annuus*) – 96 % (рис. 11).

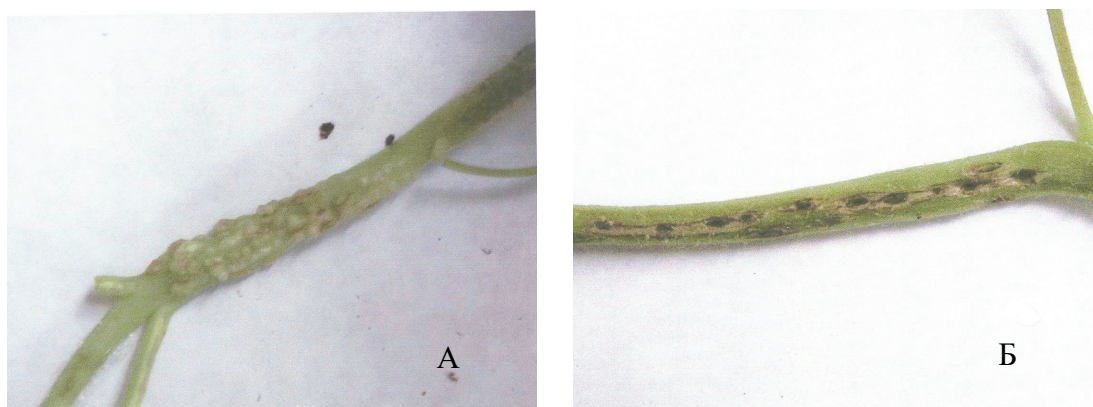


Рис. 11. Визначення антагоністичних властивостей інокулянтів бактерій, виділених з ґрунту виноградників. А – симптоми бактеріального раку після інокуляції тест-рослини *Solanum lycopersicum* суспензією бактерій патогенного штаму *R. vitis Fa-2* (10^9 КУО/мл); Б – відсутність симптомів бактеріального раку при інокуляції стебла томату суспензією суміші непатогенного інокуляту бактерій ІЛВМ1 і патогенного штаму *R. vitis Fa-2* (10^9 КУО/мл)

Виділені непатогенні ізоляти бактерій ІЛВМ1, ІЛВМ2 проявляли високу антагоністичну активність до патогенних штамів *R. vitis* і були обрані для дослідження їх можливого використання для захисту виноградних рослин від вторинного зараження ґрунтовою популяцією збудника хвороби.

Вплив термообробки виноградних рослин на збудника бактеріального раку винограду. Для оздоровлення виноградних рослин від збудника бактеріального раку визначали вплив температури на патоген винограду і можливість застосування термообробки на виробництві. З цією метою досліджували різні температурні режими: +30 °С – 10 год; +40 °С – 5 год; +50 °С – 30 хв, і поєднання вакууму і температури. Встановлено, що останнє згубно впливає на фізіологічні показники у рослин, а саме на калюсоутворення чубуків при стратифікації і розпускання вічок (табл. 8).

Таблиця 8

Вплив температури і часу експозиції на фізіологічні показники чубуків виноградної лози, середнє за 2012–2014 рр.

Сорт, кількість рослин	Умови проведення досліджень	Утворення калюсу	Проростання вічок, дні		
			15	17	25
Каберне Совіньйон, 10	30 °С 10 год	+	10	10	10
	40 °С 5 год	+	6	9	10
	50 °С 30 хв	+	3	6	6
	контроль	+	10	10	10
Каберне Совіньйон, 10 0,6 атм. 10 хв	30 °С 10 год	+	8	9	9
	40 °С 5 год	–	4	5	7
	50 °С 30 хв	–	–	2	5
	контроль	+	10	10	10
Шардоне, 10	30 °С 10 год	+	8	9	10
	40 °С 5 год	+	7	9	10
	50 °С 30 хв	+	4	6	8
	контроль	+	10	10	10
Шардоне, 10 0,6 атм. 10 хв	30 °С 10 год	+	–	5	7
	40 °С 5 год	–	–	3	5
	50 °С 30 хв	–	–	2	2
	контроль	+	10	10	10

Примітка. У дослідженнях використовували по 10 рослин кожного сорту

Встановлено, що режим +40 °С 5 год без використання вакууму виявився найбільш оптимальним для оздоровлення виноградного матеріалу від збудника бактеріального раку і не впливав на фізіологічні показники.

Бактерії з виноградних чубуків різних сортів виділяли перед термічною обробкою і після неї. Кількість вирослих колоній агробактерій і їх патогенність аналізували до і після термічної обробки чубуків (рис. 12).

Концентрація клітин мікроорганізмів значно знижувалася при двох режимах термообробки, а саме: +40 °С 5 год і +50 °С 30 хв. Проте, обробка при температурі +50 °С 30 хв негативно вплинула на фізіологічні показники виноградних рослин, що призвело до загибелі вічок. Тому режим термообробки +40 °С 5 год виявився найбільш оптимальним для оздоровлення виноградних

рослин від бактеріального раку. Вибраний температурний режим не тільки зменшує кількість агробактерій, а й імовірно, знищує Ті-плазмиду, яка і відповідає за патогенність бактерій.

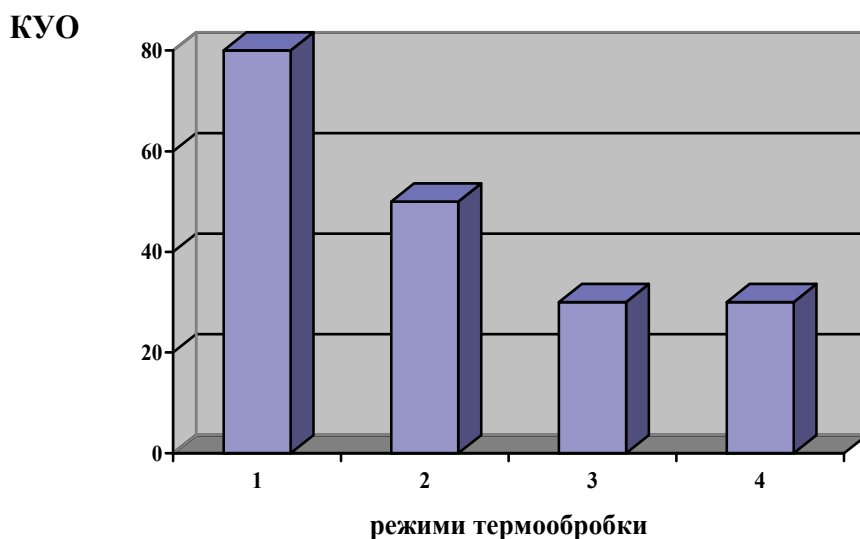


Рис. 12. Вплив різних температурних режимів термообробки виноградних чубуків на концентрацію *R. vitis*: 1 – концентрація клітин агробактерій до термообробки; різні режими випробувань: 2 – 30 °С 10 год; 3 – термообробка 40 °С 5 год; 4 – 50 °С 30 хв

Оздоровлення цінних сортів і клонів методом апікальної меристеми *in vitro*. Одним із аспектів виробництва садивного матеріалу винограду є застосування методів культури *in vitro* для отримання вихідного матеріалу сортів і клонів винограду, вільних від хвороб. Серед методів, рекомендованих до застосування стандартом ЕППО [ОЕПП/EPPO 21 Boulevard Richard Lenoir 75011 PARIS Європейська організація захисту рослин] центральне місце займає культура апікальної меристеми. Нині це один із найбільш перспективних напрямів оздоровлення цінних сортів рослин, уражених системними і хронічними хворобами винограду.

Система оздоровлення рослин *in vitro* включала наступні процеси:

1. Тестування рослин на наявність збудника бактеріального раку.
2. Відбір експлантів, їх стерилізація і культивування на поживному середовищі.
3. Мікророзмноження і укорінення погонів.
4. Адаптація мікросаджанців до ґрунтових умов шляхом висадки їх на спеціальній субстрат (цеоліт) за контрольованих умов (температура, вологість, освітлення, тривалість фотоперіоду).
5. Тестування рослин на вміст збудника бактеріального раку методом ПЛР у реальному часі після мікророзмноження.
6. Вирощування рослин в умовах теплиці.

Матеріалом для дослідження були рослини винограду *Vitis vinifera* L. сорти і клони сортів Одеський чорний, клон 11, Каберне Совіньйон, клон 15, Шардоне, клон 96, Берландієрі × Ріпарія Кобера 5 ББ, клон 211161, уражені збудником бактеріального раку.

Для оздоровлення рослинного матеріалу використовували метод культури апікальних меристем розміром 0,2–1,0 мм у поєднанні з термотерапією *in vitro* і аналізували інтенсивність регенераційних процесів росту рослин. Для вирощування мікроклонів використовували поживне середовище Мурасіге-Скуга (Murashige and Skoog, 1962). В якості експлантів використовували одновічкові мікрочубуки верхівок пагонів.

У більшості випадків повне оздоровлення садивного матеріалу, отриманого з інфікованих культур, відбувалося тільки при комбінації методів культури апікальних меристем з термотерапією при +38 °С протягом 7 діб. Відразу після цього відділяли верхівки. Після оздоровлення проводили додаткове тестування на наявність в рослинах *R. vitis* методом ПЛР. Тестування показало відсутність патогенів в цих рослинах. Мікросаджанці вирощували в культуральному боксі протягом 28–30 днів (рис. 13).



Рис. 13. Вирощування мікросаджанців сорту Каберне Совіньйон у культуральному боксі (2018 р.)

Мікроклони перед висадкою на постійне місце в теплицю, витримували в культуральних емкостях у адаптаційному боксі впродовж 10 днів для пристосування рослин до інтенсивного сонячного світла і високих температур повітря та субстрату (рис. 14).



Рис. 14. Адаптація оздоровлених рослин у адаптаційному боксі перед посадкою в теплицю (2018 р.)

Підготовлені мікроклони висаджували на постійне місце в теплицю (рис. 15). Приживлюваність рослин була на рівні 95–97 %. Оздоровленим садивним матеріалом було закладено «банк» клонів в теплиці.



Рис. 15. Рослини сорту Каберне Совіньйон, висаджені в теплицю після оздоровлення і адаптації (2018–2020 рр.)

ПОШУК ХІМІЧНИХ ЗАСОБІВ ПРОТИ ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ

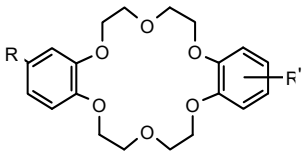
У літературі періодично з'являються повідомлення про синтез нових, іноді дуже оригінальних краун-ефірів і постійно розширюється область їх практичного використання (Андронати, 1990). Властивість краун-ефірів «коронувати» катіон, а також їх короноподібна молекулярна структура (Pedersen, 1967) прийняті за основу при назві цього класу сполук («crown» – корона).

Проведено пошук органічних сполук з антимікробною і протипухлинною активністю серед представників класу макрогетероциклічних краун-ефірів з різними функціональними групами та відбору найбільш перспективних для створення потенційних препаратів як хімічного засобу захисту рослин від збудника бактеріального раку.

В результаті скринінгу більш ніж 200 краун-ефірів виявлено представників, що мали високі показники антимікробної активності. Встановлено, що природа замісників в ароматичному кільці цих сполук, різні функціональні групи, розмір циклополіефірного кільця відіграють значну роль у виявленні антимікробних властивостей. Проаналізовано антимікробну активність у представників моно- і дибензокраун-ефірів та їх похідних з різними функціональними групами: алкіл-, нітро-, аміно-, галоген-, гідрокси-, альдегідної (формільної), карбоксильної, ацетильної, кетонної, дієнових, ароматичних (фенільної і бензильної) та амідінових фрагментів.

В результаті досліджень встановлено, високу антимікробну активність у алкілзаміщених аліфатичних краун-ефірів, з яких дитретбутил-добензо-18-краун-6 проявляв найвищі показники, пригнічував ріст всіх використаних тест-культур (табл. 9). Доведено, що на механізм дії цих краун-ефірів впливає ліпофільність та іонофорні властивості, з підвищенням цих показників зростає їх протимікробна активність.

Антимікробна активність похідних дібензо-18-краун-6

	Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК, мкг/мл)			
	<i>R. vitis Fa-2</i>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10702	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P
1. -NO ₂ (цис-, транс-)	>1000	>1000	>1000	>1000
3. -NH ₂ (цис-, транс)	800	>1000	200	180
5. -NH-COH	>1000	>1000	>1000	>1000
7. -N(C ₅ H ₁₁) ₂	210	>1000	350	250
8. -OH	>1000	>1000	>1000	>1000
9. -COH	200	>1000	200	120
10. -COOH	>1000	>1000	>1000	>1000
11. -CH=CH-COOH	>1000	>1000	>1000	>1000
12. -CH(OH)-CH ₃	250	>1000	150	300
13. -CO-CH ₃	>1000	>1000	72	54
14. -CO-C ₈ H ₁₇	>1000	>1000	400	500
15. -C(CH ₃) ₃	93	200	5	0,3
16. -C(C ₂ H ₅)(CH ₃) ₂	85	150	0,3	2
17. -C ₁₂ H ₂₅	>1000	>1000	>1000	>1000
18. -CH ₂ -C ₆ H ₅	>1000	>1000	25	4
19. -CH(CH ₃)(C ₆ H ₅)	>1000	>1000	19	1
20. -CH(C ₂ H ₅)(C ₆ H ₅)	>1000	>1000	10	0,7
21. -CH(C ₃ H ₇)(C ₆ H ₅)	>1000	>1000	12	2
22. -Br	>1000	>1000	>1000	>1000
23. -I	>1000	>1000	>1000	>1000
24. -Cl	>1000	>1000	>1000	>1000

На підставі вивчення антимікробної дії краун-ефірів було проведено випробування цих сполук на протипухлинну дію на виноградниках.

Для визначення протипухлинної активності потенційних протипухлинних препаратів в різних концентраціях і різних розчинниках проводили обробку пухлин на кущах і визначали його протягом трьох років обстеження з щорічним обліком (табл. 10).

Встановлено, що досліджені сполуки сприяли руйнуванню пухлин та інгібували ріст нових в наступному після обробки році.

Встановлено, що в результаті обробки пухлин досліджуваними препаратами відмічалось їх усихання. Щорічний облік оброблених пухлин показав відсутність новоутворювань на уражених кущах.

**Випробування препаратів на протипухлинну активність,
середнє за 2014–2016 рр.**

Препарат	Концентрація препарату, %	Кількість пухлин до обробки, шт.	Веgetуючі пухлини після обробки, шт.	Відсутність пухлин після обробки, шт.
Купролон (спиртовий розчин)	10	25	5	20
	8	25	8	17
Юглон (олійний розчин)	4	25	2	23
	3	25	2	23
Дитрет-бутил-добензо-18-краун-6 (олійний розчин)	1	25	1	24
Контроль вазелінова олія		25	25	–
Контроль Етанол	70	25	25	–

Таким чином, можливість використання цих потенційних протипухлинних препаратів може призупинити розповсюдження бактеріального раку, що сприятливо позначиться на загальному фітосанітарному стані виноградників, забезпечить більш тривале стабільне використання насаджень без втрати рослин і врожаю.

**ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ЗДОРОВИХ САДЖАНЦІВ ВІНОГРАДУ, ВІЛЬНИХ
ВІД ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ**

Розроблення заходів санітарного контролю бактеріального раку на маточниках та шкільках винограду. Європейська система санітарного контролю садивного матеріалу винограду селекційних (біологічних) категорій не включає до переліку хвороб бактеріальний рак винограду, оскільки він не часто проявляється на виноградниках країн Євросоюзу. В системі санітарного контролю у виноградних розсадниках України бактеріальний рак є одним з центральних об'єктів, котрі контролюються, про що йдеться у чинному стандарті щодо методів контролю вірусних і бактеріальних хвороб винограду (ДСТУ 8562:2015 «Маточники та садивний матеріал винограду. Методи виявлення збудників вірусних хвороб та бактеріального раку»). Періодичність заходів санітарного контролю була визначена на підставі результатів спостережень за санітарним станом маточників і шкільок винограду біологічних категорій (базові та сертифіковані) (табл. 11).

Розроблена схема методів та етапи контролю бактеріального раку винограду (включає щорічно):

1. Одноразовий візуальний санітарний відбір (контроль) клонів підщепних сортів винограду (покущово, на всіх етапах, від клонодослідної ділянки до базових маточників) на наявність уражених зразків та їх відбракування.

2. Одноразовий візуальний санітарний відбір (контроль) клонів прищепних сортів винограду (покущово, на всіх етапах, від клонодослідної

ділянки до базових маточників), яку доцільно проводити разом із другим санітарним контролем (оцінкою) на ураження вірусними хворобами наприкінці липня – початку серпня.

3. Контроль латентного ураження бактеріальним раком винограду доцільно проводити вибірково, охоплюючи таку кількість рослин: на банку клонів – по 20 % щорічно (усі рослини банку клонів повинні один раз на п'ять років пройти перевірку на збудника бактеріального раку); на базових маточниках – вибірково один раз протягом 5 років (обсяг вибірки – 1 % від загальної кількості кущів).

Таблиця 11

**Визначення етапності та частоти перевірок
на ураження бактеріальним раком у системі санітарного контролю
виробництва садивного матеріалу селекційних категорій**

Показник перевірки	Походження матеріалу та маточних насаджень		
	Матеріал клонового походження	Матеріал генеративного походження	Імпортований садивний матеріал
Етапність контролю	Клонодослідні ділянки (КДД), банк клонів, базові та сертифіковані маточники, шкільки	Гібридний розсадник, селекційний розсадник, конкурсне випробування, маточники	Садивний матеріал за ввезення
Частота контролю	1 раз на 2, 3, 5 т а 8 років – залежно від категорії насадження та патогену	Одноразово на кожному етапі після вступу в плодоносіння, маточники	Одноразово при ввезенні
Принцип вибірки	На КДД та банку клонів – індивідуальний покущовий контроль, базові маточні насадження – повне обстеження у збірних пробах, сертифіковані маточники – вибірково у збірних пробах	Вихідні сіянці – індивідуальний покущовий контроль, селекційний розсадник та конкурсне випробування – повне обстеження у збірних пробах, маточники – вибірково збірними пробами	Вибірково від 100 рослин на партію (від 10 до 250 тис. шт.) до 1 % від партії

Додаткові заходи контролю бактеріального раку винограду на маточниках зводяться до використання агротехнічних заходів обмеження поширення хвороби та оздоровлення цінних сортів і клонів методом культури апікальної меристеми, термотерапії рослинного матеріалу і використання бактерій-антагоністів для попередження вторинного ураження ґрунтовою інфекцією.

ВИСНОВКИ

У дисертації представлено результати вивчення бактеріального раку винограду, його поширення у південному регіоні України, діагностики і заходів захисту. На підставі проведених експериментальних досліджень можна сформулювати такі висновки:

1. У районі проведення досліджень бактеріальний рак винограду характеризується широким ареалом. За результатами фітосанітарного обстеження Одеської, Миколаївської і Херсонської областей встановлено, що в Одеській області поширення бактеріального раку на виноградниках становило 0,3–35 % (сорт: Каберне Совіньйон, Мерло і Шардоне), Миколаївській області – 0,6–2,5 % (сорт: Каберне Совіньйон, Одеський чорний, Мерло, Рислінг рейнський), Херсонській області – 0,3–1,4 % (сорт: Каберне Совіньйон, Шардоне, Мускат Ада, Преображеніє). Садивний матеріал для закладки виноградників в перелічених областях був переважно імпортований із Франції, Німеччини, Сербії і Італії.

2. Показано, що кліматичні зміни за роки проведення досліджень, а саме зниження температури (до -20°C) взимку, весняні приморозки в травні, істотно впливали на збільшення кількості кущів сортів неукривної культури винограду з симптомами бактеріального раку і значне його поширення на виноградниках півдня України.

3. Досліджено 46 клонів технічних сортів і 47 технічних сортів рядового садивного матеріалу, 13 клонів столових сортів і 7 столових сортів рядового садивного матеріалу, 10 клонів підщепних сортів винограду. Найбільшу кількість кущів із симптомами бактеріального раку було виявлено на сортах Каберне Совіньйон, Мерло, Шардоне імпортного походження.

4. Показано, що ураження рослин збудником бактеріального раку спричиняє зменшення рівня урожаю сорту Каберне Совіньйон, клон 15 (на 26,7 % з гектару) і сорту Шардоне, клон 96 (на 22,1 % з гектару), середньої маси грона (приблизно на 20 %), кількості пагонів виноградної лози (майже на 10 %), об'єм однорічного приросту (на 6 %), значне зниження масової концентрації цукру в ягодах (до 15–19 %) і збільшення масової концентрації титрованих кислот ($11,2\text{ г/дм}^3$) порівняно з контрольною групою здорових рослин.

5. Встановлено, що при виробництві на саджанцях (у місцях щеплення) утворюються пухлини, як інфекційного (внаслідок ураження *R. vitis*), так і фізіологічного (розростання калюсної тканини у місцях пошкодження чубуків). Вперше в Україні застосовано метод виділення Ті-плазмід для ідентифікації пухлин інфекційного і фізіологічного походження, які не можливо візуально відрізнити.

6. Удосконалено метод ідентифікації збудника бактеріального раку винограду за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (РЧ-ПЛР) з використанням трьох тест-систем: PGF/PGR, VIR2A/VIR2C і VIRFF1/VIRFR2, які кодують фактори вірулентності. Оптимізовано температурно-часові режими ПЛР з видоспецифічними праймерами.

Розроблена мультиплексна ПЛР у режимі реального часу дозволяє оперативно аналізувати різні штами патогенних ізолятів агробактерій. У них виявлено ген *pehA*, що свідчить про їх належність до *R. vitis*. Проаналізовано структуру популяції *R. vitis* Одеської, Миколаївської і Херсонської областей

з використанням тест-систем VIRD2A/VIRD2C і VIRFF1/VIRFR2. Показано, що популяція збудника хвороби є гетерогенною і за типом Ті-плазмід складається з 80 % ізолятів з октопіновим і нопаліновим і 20 % – вітопіновим типом плазміди.

7. Досліджено стійкість різних прищепних і підщепних сортів до зараження збудником бактеріального раку. Встановлено, що деякі сорти (Піно нуар, клон 667, Голубок, клон 4656, Піно чорний, Мечта, клон 244, Берландієрі × Рипарія СО4, клон 1791 і Рипарія × Рупестріс 101-14, клон 1182) були більш стійкими в умовах штучного зараження референтним штамом *R. vitis* порівняно із сприйнятливими сортами: Каберне Совін'йон, Мерло, Одеський чорний. Це дає можливість контролювати популяцію *R. vitis* за допомогою стійкості сортів.

8. Показано, що виділені непатогенні ізоляти агробактерій ІЛВМ1 та ІЛВМ2 уповільнювали активність розвитку бактеріального раку *in vitro* та *in vivo* на тест-рослинах *Solanum lycopersicum* і *Helianthus annuus*, мають антагоністичні властивості щодо збудника бактеріального раку винограду, що надає можливість використати ці штами як потенційні біологічні препарати для запобігання вторинного ураження саджанців ґрунтовим інокулюмом *R. vitis*.

9. Досліджено вплив різних режимів термотерапії виноградної лози та саджанців на кількісний вміст і патогенні властивості агробактерій, а також на фізіологічні показники матеріалу *Vitis vinifera* L. при підготовці його до щеплення: калюсоутворення, проростання вічок. Доведено, що використання термотерапії з режимами: 30 °С 10 год, 40 °С 5 год, 50 °С 30 хв в поєднанні з вакуумом у камері згубно впливає на розпускання вічок і калюсоутворення. Підібрано оптимальний режим для проведення водної термотерапії виноградної лози та саджанців, який становить 40 °С протягом 5 год без використання вакууму.

10. Доведено, що метод культури апікальних меристем (0,2–1,0 мм) сприяє оздоровленню рослин, уражених збудником бактеріального раку і було використано для закладення «банку» клонів цінних сортів винограду в теплиці.

11. Вперше проведено систематичне вивчення антимікробної активності для широкого спектру аліфатичних, циклоаліфатичних, ароматичних краун-ефірів (понад 200 сполук) для визначення активності препаративної форми захисту виноградних рослин від бактеріального раку. Досліджені сполуки мали досить високу антимікробну активність, яка перевищувала таку для найбільш ефективних природних антибіотиків. Показано визначальну роль «комплексонових» фрагментів у молекулах заміщених бензо- (добензо-) краун-ефірів і їх циклоаліфатичних аналогів, насамперед, третбутильного та інших замісників для появи високої антимікробної активності. Доведено, що на механізм дії впливає їх ліпофільність та іонофорні властивості, з підвищенням цих показників зростає їх протимікробна активність.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для запобігання поширення бактеріального раку на виноградниках півдня України, отримання здорових саджанців і зменшення втрат врожаю сформульовано пропозиції для виробників садивного матеріалу різних форм власності і лабораторій, які мають уповноваження на проведення діагностики бактеріального раку.

У виноградарських розсадниках пропонується профілактичні заходи:

– регулярне візуальне обстеження виноградних насаджень з метою виявлення кущів із симптомами бактеріального раку і знищення, або внесення їх в карантинну групу;

– для оздоровлення цінних сортів і клонів проводити термообробку рослинного матеріалу, використовуючи оптимальний режим водної термотерапії (40 °С протягом 5 год);

– ретельно відбирати маточний матеріал, який використовується для щеплення;

– для запобігання ураження ґрунтовим іноккуломом рекомендувати виробникам біологічних і хімічних засобів захисту доопрацювати препаративні форми непатогенних агробактерій (ІЛВМ1 і ІЛВМ2) і краун-ефірів провести їх випробування, передбачені чинним законодавством України для включення їх у Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні.

Перед придбанням імпортного або вітчизняного садивного матеріалу і контролю фітосанітарного стану виноградників необхідно проводити перевірку наявності латентної форми бактеріального раку в лабораторіях фітосанітарних служб з використанням серологічних і молекулярно-біологічних методів діагностики. Використання мультиплексної ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією значно скоротить тривалість діагностики.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографії

1. Мулюкіна Н. А., **Конуп Л. А.** Система санітарного контролю посадочного матеріала винограда в Україні. Виноградарство Северного Причорномор'я: монографія. Арциз, 2009. 112 с. *(Здобувачем проведено дослідження, узагальнено результати, написано розділи щодо моніторингу бактеріального раку винограду).*

2. Мілкус Б. Н., Лиманська Н. В., Жунько І. Д., **Конуп Л. О.** Вірусні, бактеріальні і фітоплазмові хвороби винограду. Одеса, 2012. 296 с. *(Здобувачем проведено дослідження, узагальнено результати, написано розділ щодо діагностики бактеріального раку винограду).*

3. Гадзало Я. М., Власов В. В., Мулюкіна Н. А., Джабурія Л. В., Тулаєва М. І., Чісніков В. С., Ковальова І. А., Герус Л. В., **Конуп Л. О.**, Зеленянська Н. М. Система сертифікованого виноградного розсадництва України. К., 2015. 288 с. *(Здобувачем проведено дослідження, узагальнено*

результати, написано розділ «Поширення і діагностики вірусних, фітоплазмових хвороб і бактеріального раку винограду»).

Розділи у монографіях

4. **Конуп Л. А.**, Мулюкіна Н. А., Конуп А. И., Чистякова В. Л., Николаева Н. И. Объекты системы санитарной сертификации (вирусы, бактерии, фитоплазмы). Виноград: монографія. Одесса, 2018. С. 315–347. *(Здобувачем проведено дослідження, узагальнено результати, написано розділ «Поширення і діагностики вірусних, фітоплазмових хвороб і бактеріального раку винограду»).*

5. Камалов Г. Л., Котляр С. А., Григораш Р. Я., Ткачук В. В., Чуприн Г. Н., Шишкин О. В., Конуп И. П., **Конуп Л. А.** Симметричные и несимметричные дибензокраун-эферы, их производные, изомеры и нецилические аналоги. Синтез, структура, свойства. Химия и биологическая активность синтетических и природных соединений. Кислород- и серо-содержащие гетероциклы: монографія. Т. 1. Москва, 2003. С. 260–267. *(Здобувачем проведено скринінг органічних сполук на наявність антимікробної активності).*

Статті у наукових фахових виданнях України,

у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних

6. **Конуп Л. А.**, Гайдай А. Е., Милкус Б. Н. Бактериальный рак винограда в Украине. Вісник Одеського національного університету. 2001. Т. 6. Вип 4. С. 181–183. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень та визначення протипухлинної дії краун-ефірів).*

7. Лиманская Н. В., Жунько И. Д., **Конуп Л. А.**, Милкус Б. Н. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики *A. vitis*. Виноградарство и виноделие. 2003. № 3. С. 14–16. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень).*

8. Конуп И. П., Котляр С. А., **Конуп Л. О.** Протимікробна активність перфторалкил-бензо- і дибензо-краун-етерів. Одеський медичний журнал. 2005. № 5 (73). С. 14–17. *(Здобувачем проведено визначення антимікробної дії краун-ефірів).*

9. Ліманська Н. В., Жунько І. Д., Милкус Б. Н., **Конуп Л. О.** Виявлення *ipt*-позитивних штамів агробактерій у тканинах винограду методом ПЛР. Вісник Одеського національного університету. 2005. Т. 10. № 3. С. 143–148. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження).*

10. Милкус Б. Н., Лиманская Н. В., Жунько И. Д., **Конуп Л. А.**, Бойко О. А. Виявление возбудителя бактериального рака в почве виноградника в разные сезоны вегетации. Виноградарство и виноделие. 2007. Т. XXXVII. С. 66–68. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень, відібрано зразки для досліджень).*

11. Милкус Б. Н., **Конуп Л. А.**, Конуп А. И., Бойко О. А. Термотерапия винограда в борьбе с фитоплазменной инфекцией. Виноградарство и виноделие.

2007. № 1. С. 6–7. (Здобувачем підібрано умови проведення термообробки рослинного матеріалу винограду).

12. Клечковський Ю.Е., Кульмінська Л.О., **Конуп Л.О.** Бактеріальне в'янення винограду. Карантин і захист рослин. 2008. № 4 (142). С. 26-27. (Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень та написано частину статті).

13. **Конуп Л. А.**, Бойко О. А., Конуп А. И. Испытание отечественных препаратов против возбудителя бактериального рака – биотип 3 (*Agrobacterium vitis*) в условиях *in vitro* и *in vivo*. Виноградарство и виноделие. 2008. Т. XXXVIII. С. 35–37. (Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень, виявлено і досліджено антагоністичні властивості агробактерій та написано статтю).

14. **Конуп Л. А.**, Мулюкіна Н. А., Чистякова В. Л., Щербина А. В., Конуп А. И. Бактериальный рак и фитоплазменная инфекция винограда: диагностика, идентификация, меры борьбы. Виноградарство і виноробство. 2009. № 46 (2). С. 41–43. (Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень, узагальнено експериментальні дані і написано статтю).

15. Мулюкіна Н. А., **Конуп Л. О.**, Чистякова В. Л., Щербина А. В. Конуп А. І. Ідентифікація деяких хвороб винограду сучасними методами діагностики. Виноградарство і виноробство. 2009. С. 136–140. (Здобувачем узагальнено експериментальні дані і написано статтю).

16. **Конуп Л. О.**, Мулюкіна Н. А., Чистякова В. Л., Щербина А. В. Використання штамів антагоністів агробактерій щодо захисту винограду від збудника бактеріального раку винограду. Виноградарство і виноробство. 2010. № 47. С. 84–89. (Здобувачем узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

17. **Конуп Л. О.**, Щербина А. В., Чистякова В. Л., Конуп А. І. Вірусні, бактеріальні і фітоплазмові хвороби винограду на півдні України. Виноградарство і виноробство. 2011. Вип. 48. С. 92–96. (Здобувачем узагальнено експериментальні дані і написано статтю).

18. Конуп Л. О. Виявлення збудників почорніння деревини і бактеріального раку винограду на півдні України. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2011. № 5 (27). URL: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_5/11klo.pdf.

19. Конуп Л. О. Почорніння деревини винограду і його поширення на півдні України. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2011. № 2 (24). URL: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_2/11klo.pdf

20. **Конуп Л. О.**, Чистякова В. Л., Конуп А. І., Ніколаєва Н. І. Виявлення латентної форми збудника бактеріального раку в деяких сортах виноградних рослин. Виноградарство і виноробство. 2013. Вип. 50. С. 132–134. (Здобувачем узагальнено експериментальні дані, написано статтю).

21. Клечковський Ю. Е., Кульмінська Л. О., **Конуп Л. О.** Почорніння деревини винограду. Карантин і захист рослин. 2013. № 3 (200). С. 6–9.

(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень та написано частину статті).

22. Конуп А. І., Чистякова В. Л., **Конуп Л. О.** Вірусні і фітоплазмові хвороби винограду. Діагностика. Біоресурси і природокористування. 2014. № 3–4. Т. 6. С. 77–80. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

23. Конуп А., Чистякова В., **Конуп Л.** Вірусні, бактеріальні і фітоплазмові хвороби винограду на півдні України. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2015. Вип. 70. С. 206–212. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень та написано частину статті).*

24. Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., **Конуп Л. О.** Виявлення і ідентифікація вірусу скручування листя виноградної лози на виноградниках Одеської області. Карантин і захист рослин. 2019. № 3–4 (254). С. 13–16. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, написано статтю).*

25. Конуп А. І., Мулюкіна Н. А., **Конуп Л. О.** Виявлення вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб виноградних рослин на виноградниках Одеської області та їхня діагностика. Вісник аграрної науки. 2019. № 4. С. 24–29. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

Статті у наукових виданнях іншої держави

26. Власов В. В., **Конуп Л. О.**, Чистякова В. Л., Конуп А. І. Виявлення вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб винограду на півдні України. Aktualne problemy w współczesnej nauce. 2013. Секція: біологія. С. 6–8. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані і написано статтю).*

27. Власов В. В., **Конуп Л. О.**, Конуп А. І., Чистякова В. Л. Бактеріальний рак і заходи щодо захисту винограду від цього збудника. Nauka, problem, osiagniescia, innowacyjnose, praktyku, teoria. 2015. Секція: біологія. С. 42–45. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані і написано статтю).*

28. Власов В. В., **Конуп Л. О.** Бактеріальний рак винограду і біологічні заходи щодо захисту від нього. East European Scientific Journal. 2016. Vol. 2 (16). P. 149–153. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

29. **Конуп Л. А.**, Конуп А. І., Власов В. В., Чистякова В. Л. Діагностика и идентификация возбудителей вирусных, бактериальных и фитоплазменных болезней винограда в Украине. Scientia. Химия. Биология. Медицина. 2016. № 2. С. 29–33. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

30. Власов В. В., **Конуп Л. О.**, Чистякова В. Л. Бактеріальний рак винограду і біологічні заходи щодо захисту від нього. East European Scientific Journal. 2016. Vol. 2 (16). P. 149–153. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

31. Vlasov V. V., **Konup L. O.**, Muljukina N. A., Geretskij R. V. Sanitary Certification in the Production of Grapevine Planting Material Biological Categories: European Experience and Ukrainian Realities. Bulletin (Scientific Papers). 2018.

№ 1/(39). Р. 83–86. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

Статті в інших наукових виданнях

32. Богатский А. В., Лукьяненко Н. Г., Сечняк Л. К., Киндрук Н. А., Слюсаренко О. К., Захариєва З. Е., Конуп И. П., Олешко А. Я., **Портная Л. А. (Конуп Л. А.)** 15-краун-5 – новый стимулятор роста растений. Физиология растений. 1984. Т. 31. Вып. 6. С. 1180–1185. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, узагальнено експериментальні дані).*

33. Лукьяненко Н. Г., Богатский А. В., Назаров Е. И., **Портная Л. А. (Конуп Л. А.)**, Сторчило О. В., Конуп И. П. Повышение гербицидной активности эптама с помощью 15-краун-5. Физиология и биохимия культурных растений. 1985. Т. 17. № 5. С. 497–501. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено експериментальні дослідження).*

34. Конуп И. П., Скляр В. Е., Косенко К. Н., Городнюк В. П., Федорова Г. В., Назаров Е. И., Котляр С. А., **Конуп Л. А.** Антимикробная активность алифатических и ароматических краун-эфиров. Химико-фармацевтический журнал. 1989. № 5. С. 578–583. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

35. Котляр С. А., Городнюк В. П., Конуп И. П., **Конуп Л. А.** Синтез и противомикробная активность производных аминобензокраун-эфиров. Химико-фармацевтический журнал. 1989. № 11. С. 1342–1347. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

36. Кульмінська Л. О., **Конуп Л. О.** Карантинні хвороби на виноградниках. Небезпека завезення та заходи запобігання проникненню на території України. Аграрник. 2008. № 7. С. 22–23. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження виноградних насаджень, проведено діагностику хвороб та написано частину статті).*

37. Кульминская Л. А., **Конуп Л. А.** Выявление и идентификация бактериального увядания винограда. Фитосанитарная безопасность и контроль сельскохозяйственной продукции. Информационный бюллетень. 2013. № 44. С. 163–168. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, узагальнено експериментальні дані).*

38. **Конуп Л. О.**, Чистякова В. Л., Конуп А. І., Ніколаєва Н. І. Вдосконалення заходів щодо захисту винограду від системних хвороб з метою здійснення фітосанітарного контролю за станом насаджень винограду. Виноградарство і виноробство. 2014. Вып. 51. С. 154–156. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані і написано статтю).*

Методичні рекомендації

39. Власов В. В., Мулюкина Н. А., **Конуп Л. А.** Методические рекомендации по профилактике бактериального рака винограда. Одеса, 2012. 11 с. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані і написано рекомендації).*

Патенти та авторські свідоцтва

40. Котляр С. А., **Конуп Л. А.**, Конуп И. П., Климова Е. И. Способ получения 4-трет-бутилдобензо-18-краун-6. А. с. 1617903 СССР. Заявка № 4611774; заявлено 1.09.90; опубликовано 1.09.90. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані).*

41. Котляр С. А., **Конуп Л. А.**, Конуп И. П., Климова Е. И. Способ получения 4-трет-бутилдобензо-24-краун-6. А. с. 1617902 СССР. Заявка № 4611774; заявлено 1.09.90; опубликовано 1.09.90. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані).*

42. Мілкус Б. Н., Іваниця В. О., Лиманська Н. В., Жунько І. Д., **Конуп Л. О.**, Шилов В. І., Гудзенко Т. В. Техпроцес діагностики бактеріального раку винограду. Патент України на корисну модель. № 19085. 2006-12-15. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані).*

Тези наукових доповідей

43. Konup I. P., **Konup L. A.**, Gorodnyuk V. P., Klimova E. I. Study of antimicrobial properties in crown-ethers series. 15th International symposium on macrocyclic chemistry. Thesis of lectures Odessa, 1990. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

44. **Konup L. A.**, Klimova E. I., Gorodnyuk V. P., Konup I. P., Nasarov E. I. Study of physico-chemical aspect of antimicrobial effect of crown compounds. 15th International symposium on macrocyclic chemistry. Thesis of lectures Odessa, 1990. P. 240. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

45. Fedorova G. V., Ivanov E. I., **Konup L. A.** The synthesis of novel derivatives of DA-18-k-6-the potential complexing and antimicrobial agents. The 5th International Seminar of Inclusion Compound. Gdansk, 1994. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

46. Конуп И. П., Котляр С. А., Григораш Р. Я., Ткачук В. В., Городнюк В. П., Камалов Г. Л., **Конуп Л. О.** Вивчення протимікробної активності краун-сполук. XIX Українська конференція з органічної хімії. Львів, 2001. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

47. Милкус Б. Н., Гайдай А. Е., **Конуп Л. А.** Бактериальный рак винограда на Украине и меры борьбы с ним. Международная научно-практическая конференция «Иммунитет и фитосанитарная селекция в системе интегрированной защиты виноградных насаждений». г. Кишинев, 31 августа – 1 сентября 2001 года: тезисы докладов. Кишинев, 2001. С. 24–25. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані).*

48. Котляр С. А., Конуп И. П., Камалов Г. Л., **Конуп Л. А.** Связь структура-свойство в ряду изомерных добензо-краун-эфиров. Научный семинар «Связь структура-активность биологически активных соединений». Май 2002 г.,

Гурзуф. 2002. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

49. Kotlyr S. A., Grygorash R. Ya., Tkachyk V. V., Chuprin G. N., Konup I. P., Kamalov G. L., **Konup L. A.** Concerning the interconnection type «Structure-properties» in the dibenzocrown ethers'line. XXVII International Symposium on Macrocyclic Chemistry. 2002. U.S.A. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

50. Конуп И. П., **Конуп Л. А.**, Григораш Р. Я., Ткачук В. В., Плужник-Гладырь С. М., Котляр С. А., Камалов Г. Л. Антибактериальная активность в ряду дибензокраун-эфиров Тезисы доклада Международного симпозиума по супрамолекулярной химии. Киев, 2003. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

51. Муратов Е. Н., Артеменко А. Г., Кузьмин В. Е., Камалов Г. Л., Котляр С. А., Григораш Р. Я., Конуп И. П., **Конуп Л. А.** Анализ противомикробной активности различных краун-эфиров с помощью иерархической системы моделей 2D-4D QSAR. Тезисы доклада Международного симпозиума по супрамолекулярной химии. Киев, 2003. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, проведено визначення антимікробної дії краун-сполук).*

52. Мілкус Б. Н., **Конуп Л. О.**, Ліманська Н. В., Жунько І. Д. Діагностика вірусів і збудника бактеріального раку винограду за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. X з'їзд Товариства мікробіологів України, м. Одеса, 15–17 вересня 2004 року: тези доповіді. Одеса, 2004. С. 286. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, узагальнено експериментальні дані).*

53. Лиманская Н. В., Жунько И. Д., Милкус Б. Н., **Конуп Л. А.** Бактериальный рак на импортных саженцах винограда и в почве на виноградниках. Проблемы збереження, відновлення та збагачення біорізноманітності в умовах антропогенно зміненого середовища: Міжнародна наукова конференція, м. Дніпропетровськ, 16–19 травня 2005 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2005. С. 453–454. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, узагальнено експериментальні дані).*

54. Ліманська Н. В., Жунько І. Д., **Конуп Л. О.** Бактеріальний рак винограду в умовах півдня України. Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Проблеми фундаментальної і прикладної екології, екологічної геології та раціонального природокористування». Кривий Ріг, 2006. С. 86–89. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, узагальнено експериментальні дані).*

55. **Конуп Л. А.**, Бойко О. А., Чистякова В. Л. Вирусные, бактериальные и фитоплазменные болезни винограда в Украине. Перспективы развития виноградарства и виноделия в странах СНГ. Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 180-летию НИВиВ «Магарач». Т. 2. Ялта, 2008. С. 28–30. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані).*

56. Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп А. І., Щербина А. В., Мулюкіна Н. А., **Конуп Л. О.** Бактеріальні, вірусні і фітоплазмові хвороби

винограду на півдні України. XII з'їзд товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського. Ужгород. 2009. С. 307. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, проведено діагностику, узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

57. Milkus B., **Конуп Л.** Emerging diseases of the grapevine at the Ukraine. 16th ICVG Meeting: Abstracts, France, 12–17th September, 2009. Paris, 2009. P. 164. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, проведено діагностику, узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

58. **Конуп Л. О.**, Мулюкіна Н. А., Чистякова В. Л., Конуп А. І., Щербина А. В. Фітосанітарний стан виноградних насаджень півдня України. Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин і біобезпека: VI Міжнародна науково-практична конференція, Геном рослин VI, м. Одеса, 7–10 вересня 2010 року: тези доповіді. Одеса, 2010. С. 21. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, проведено діагностику, узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

59. Мулюкіна Н. А., **Конуп Л. О.**, Ковальова І. А., Зеленянська Н. М., Лосєва Д. Ю. Санітарна оцінка інтродукованих та вітчизняних клонів винограду і отримання вихідного матеріалу, вільного від скручування листя. Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин і біобезпека: VI Міжнародна науково-практична конференція, Геном рослин VI, м. Одеса, 7–10 вересня 2010 року: тези доповіді. Одеса, 2010. С. 25. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, проведено діагностику).*

60. **Конуп Л. О.**, Мулюкіна Н. А., Чистякова В. Л., Конуп А. І., Щербина А. В. Фітосанітарний стан виноградних насаджень півдня України. Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин і біобезпека: VI Міжнародна науково-практична конференція, Геном рослин VI, м. Одеса, 7–10 вересня 2010 року: тези доповіді. Одеса, 2010. С. 21. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані і написано статтю).*

61. **Конуп Л. О.**, Мулюкіна Н. А., Чистякова В. Л., Конуп А. І., Щербина А. В. Фітосанітарний стан виноградних насаджень півдня України. Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин і біобезпека: VI Міжнародна науково-практична конференція, Геном рослин VI, м. Одеса, 7–10 вересня 2010 року: тези доповіді. Одеса, 2010. С. 21. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані і написано статтю).*

62. Чистякова В. Л., Щербина А. В., **Конуп Л. О.**, Конуп А. І. Виявлення вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб на столових сортах винограду. Инновационные технологии в развитии столового виноградарства: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов, м. Одеса, 30 августа 2011 года. Одеса, 2011. С. 109–112. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані і написано статтю).*

63. Милкус Б. Н., Лиманская Н. В., Жунько И. Д., **Конуп Л. А.** Вирусные и бактериальные заболевания винограда в Украине. Интегрированная защита

растений: стратегия и тактика. Прилуки, 2011. С. 537–543. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження).*

64. Vlasov V., **Konup L.**, Chistyakova V., Konup A. Identification of causes of diseases of grapes by Elisa and PCR. 17th ICVG Meeting, Davis, California, USA, 7–11 October 2012. Davis, 2012. *(Здобувачем узагальнено експериментальні дані).*

65. Timina O., Timin O., Vasieva Z., **Konup L.**, Chistyakova V., Varavay V. Monitoring of the stolbur wilting disease on the vegetable pepper in the transmistran region. Conference in Italy, August, 2013. *(Здобувачем проведена діагностика збудника).*

66. Vlasov V., **Konup L.**, Konup A., Chistyakova V. Grapevine virus diseases testing in the seedlings introduced to Ukraine. 18th ICVG Meeting, Anara, Turkey, 7–11 September 2015: Book of Abstracts. Ankara, 2015. P. 151–153. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані і написано статтю).*

67. **Конуп Л. А.**, Власов В. В., Конуп А. И., Чистякова В. Л. Бактериальные болезни винограда. Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия: XVII Международная научно-практическая конференция. Новосибирск, 2016. С. 129–133. *(Здобувачем проведено фітосанітарне обстеження, діагностику, узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

АНОТАЦІЯ

Конуп Л. О. Бактеріальний рак винограду і обґрунтування заходів щодо обмеження його розвитку в південному регіоні України. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук зі спеціальності 06.01.11 «Фітопатологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2021.

Дисертацію присвячено актуальній проблемі в галузі виноградарства – вивченню поширення бактеріального раку на території Одеської, Миколаївської та Херсонської областей південного регіону України, удосконаленню методів діагностики, розробленню хімічних і біологічних заходів захисту рослин від бактеріального раку.

Актуальність досліджень визначається зростанням вимог до якості виноградної і виноробної продукції. Проводили фітосанітарні обстеження на наявність зовнішніх симптомів бактеріального раку промислових виноградників півдня України. Методом ІФА підтверджено, що накопичення патогенних бактерій в різних частинах виноградної рослини коливається протягом усього вегетаційного періоду від максимального до мінімального, найкращим матеріалом для ідентифікації є пухлини, коріння і чубуки виноградної лози.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в такому: проведено моніторинг ураженості бактеріальним раком виноградників в Одеській,

Миколаївській та Херсонській областях південного регіону і встановлено їх стан у зв'язку зі змінами клімату; проведено дослідження стійкості окремих сортів винограду до ураження збудником бактеріального раку винограду, розроблено експрес-метод виявлення пухлин.

Вперше в Україні було застосовано метод ідентифікації ізолятів бактерій за допомогою ПЛР в режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією (Real time PCR).

Розроблено метод і підібрані умови для проведення термотерапії для знезараження виноградних рослин від бактеріального раку. Виділено з ґрунту непатогенні бактерії, які мали антагоністичні властивості щодо збудника хвороби.

Знайдено ефективний хімічний препарат дитретбутилдибензо-18-краун-6, який має високу антимікробну і протипухлинну активність.

Ключові слова: збудник бактеріального раку винограду, ПЛР у реальному часі, виноградник, термотерапія, бактерії антагоністи, краун-ефіри.

АННОТАЦІЯ

Конуп Л. А. Бактериальный рак винограда и обоснование мероприятий по ограничению его развития в южном регионе Украины. Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 06.01.11 «Фитопатология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2021.

Диссертация посвящена актуальной проблеме в области виноградарства: изучению распространения бактериального рака на территории Одесской, Николаевской и Херсонской областей (Южного региона Украины), усовершенствованию методов диагностики, разработке химических и биологических мер борьбы с бактериальным раком.

Актуальность исследований определяется возросшими требованиями к качеству потребляемой человеком продукции, в том числе – к продукции виноградарства и виноделия. Полевые исследования проводили на виноградниках трех областей Украины: Одесской, Николаевской и Херсонской, изучали фитосанитарное состояние насаждений в связи с изменениями климата. В результате чего установлено массовое распространение бактериального рака, особенно на сортах: Каберне Совиньон, Мерло и Шардоне, завезенных из Франции, Италии, Германии, Сербии.

Доказано значительное снижение урожая, сахаристости, биометрических характеристик у зараженных растений, повышение титруемой кислотности.

Идентификацию возбудителя и диагностику болезни проводили лабораторными методами ИФА и ПЦР. Доказано, что патогенные бактерии могут находиться в разных частях виноградного куста на протяжении всего вегетационного периода: от максимального до минимального. Установлено, что наибольшая концентрация бактерий у зараженных растений находится в опухлях, корнях и одревесневших черенках виноградной лозы.

Проведены исследования по определению устойчивости сортов винограда к возбудителю бактериального рака. Установлено, что все исследованные сорта и клоны склонны к заражению возбудителем бактериального рака, кроме таких сортов как: Пино нуар, клон 667, Голубок, клон 4656, Пино чорний, Мечта, клон 244, из подвойных – Берландиери × Рипария СО4, клон 1791 и Рипария × Рупестрис 101-14, клон 1182, в то время как сорта: Каберне Совиньон, Мерло иностранной селекции и Одесский черный, отечественный сорт имели высокий процент поражения.

Разработан экспресс-метод идентификации опухолей бактериального происхождения, основанный на определении содержания в них опинов.

Впервые в Украине был применен метод идентификации изолятов бактерий с помощью ПЦР в режиме реального времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией (Real time PCR). В результате проведенных исследований установлено, что выделенные из различных частей растений изоляты агробактерий относятся к патогенному виду *Rhizobium vitis*, идентификация по типу плазмид показала, что большинство бактерий оказались октопинсодержащими.

Разработан метод и подобраны условия для проведения термотерапии для оздоровления виноградных растений, зараженных бактериальным раком.

Исследовали почву в ризосфере куста и междурядьях виноградников на наличие непатогенных бактерий, которые обладают антагонистическими свойствами по отношению к возбудителю болезни. Из 50 выделенных изолятов выявили два, которые обладали высокой антагонистической активностью.

Для оздоровления ценных сортов и клонов винограда от бактериального рака предложен метод культуры апикальных меристем, размером 0,2–1,0 мм в сочетании с термотерапией при температуре 38 ± 1 °C в течение 7 суток. Тестирование растительного материала после проведения оздоровления методом ПЦР показало отсутствие в нем возбудителя бактериального рака.

Был проведен скрининг более чем 200 краун-эфиров с различными функциональными группами и анализ антимикробной активности по отношению к использованным грамположительным и грамотрицательным бактериям. Установлено, что некоторые представители этого класса соединений имели высокие показатели противомикробных свойств, из которых наиболее активным оказался дитретбутилдибензо-18-краун-6, который обладал и противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: возбудитель бактериального рака винограда, ПЦР в реальном времени, виноградник, термотерапия, бактерии антагонисты, краун-ефиры.

ANNOTATION

Konup L. O. Crown Gall of Grapes and Substantiation of Measures to Restrict its Development in the Southern Region of Ukraine. On the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of agricultural sciences on a specialty 06.01.11 «Phytopathology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the actual problem in the field of viticulture of studying the spread of crown gall in the territory of the Odesa, Mykolaiv and Kherson regions of the southern region of Ukraine, improving the methods of diagnosis, the development of chemical and biological measures to combat crown gall.

The relevance of research is determined by the growth of product quality consumed by man, including the products of viticulture and winemaking. A phytosanitary examination was carried out for the presence of external symptoms of crown gall of industrial vineyards of the South of Ukraine. The ELISA method confirmed that the accumulation of pathogenic bacteria in different parts of the grape plant varies throughout the growing season from the maximum to the minimum, the best material for identification are tumors, roots and currency of the grape vines.

The scientific novelty of the obtained results is that the impairment of the vineyards by crown gall in the Odesa, Mykolaiv and Kherson regions of the southern area has been carried out and their state has been established due to climate change; Stability studies of individual grape varieties for possible infection of the causative agent of crown gall grape were carried out, an express method of detecting tumors was developed.

For the first time in Ukraine, the method of identifying bacteria isolates using PCR in real time with hybridization-fluorescent detection has been applied (Real Time PCR). The PCR method is verified in real time to identify bacteria isolates. The method of diagnosing crown gall using multiplex PCR in real time is modified.

The optimal conditions for conducting thermotherapy for the disinfection of grape plants from crown gall of grapes have been established. Nonpeatogenic bacteria are isolated from the soil, which have antagonistic properties in relation to the causative agent.

The effective chemical preparation has been found to diterebuladibenzo-18-Kraun-6, which possessed high antimicrobial and anti-opuleval activity.

Key words: crown gall, polymerase chain reaction, grape-vine, thermotherapy, bacteria are antagonists, crown ethers.

Підписано до друку 26.11.2021 року. Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 1,9 Обл.-вид.арк. 1,9
Наклад 100 прим. Зам. № 210806

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55, e-mail: nubip_druk@ukr.net
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011

